



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Química e Ingeniería Química

Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial

Diseño y construcción de un biorreactor “Airlift” y determinación de parámetros de operación óptimos para su aplicación en procesos fermentativos

TESIS

Para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial

AUTOR

David HUAMÁN GASTELÚ

Emil Homero LEÓN FLORES

ASESOR

PhD. Waldir Desiderio ESTELA ESCALANTE

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Huamán, D. & León, E. (2019). *Diseño y construcción de un biorreactor “Airlift” y determinación de parámetros de operación óptimos para su aplicación en procesos fermentativos*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA
Central: 619 7000 anexos 1202, 1203, 1205, 1206, 1207 Telefax: 1209, 1218
Ciudad Universitaria - Av. Venezuela s/n - Lima 1

"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"
"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para mujeres y hombres"

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

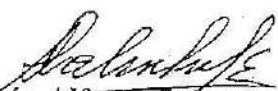
A C T A DE TITULACION POR TESIS


Los suscritos Miembros del Jurado nombrados por la Dirección de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, bajo la Presidencia del Dr. RUBÉN ALFREDO PALOMINO INFANTE (Presidente), el Ing. PEDRO JOSÉ ROMERO Y OTINIANO (Miembro) y el Ph.D. WALDIR DESIDERIO ESTELA ESCALANTE (Asesor), habiendo presentado para el efecto la TESIS, titulada "DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN BIORREACTOR "AIRLIFT" Y DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE OPERACIÓN ÓPTIMOS PARA SU APLICACIÓN EN PROCESOS FERMENTATIVOS", después de SUSTENTADA Y APROBADA LA TESIS elaborado por el Bachiller en Ingeniería Agroindustrial: EMIL HOMERO LEÓN FLORES; para optar el TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL, acordando calificarlo con la NOTA de:


Diecisiete
(LETRAS)


(17)
(NÚMEROS)

Lima, 21 de diciembre del 2018


Dr. Rubén Alfredo Palomino Infante
Presidente


Ing. Pedro José Romero Y Otiniano
Miembro


Ph.D. Waldir Desiderio Estela Escalante
Asesor


Ph.D. Jorge Ernesto Guevara Vasquez
Director de la EP de Ingeniería Agroindustrial





UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA
Central: 619 7000 anexos 1202, 1203, 1205, 1206, 1207 Telefax: 1209, 1218
Ciudad Universitaria - Av. Venezuela s/n - Lima 1

"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para mujeres y hombres"

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

ACTA DE TITULACION POR TESIS

Los suscritos Miembros del Jurado nombrados por la Dirección de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, bajo la Presidencia del Dr. RUBÉN ALFREDO PALOMINO INFANTE (Presidente), el Ing. PEDRO JOSÉ ROMERO Y OTINIANO (Miembro) y el Ph.D. WALDIR DESIDERIO ESTELA ESCALANTE (Asesor), habiendo presentado para el efecto la TESIS, titulada "DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN BIORREACTOR "AIRLIFT" Y DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE OPERACIÓN ÓPTIMOS PARA SU APLICACIÓN EN PROCESOS FERMENTATIVOS", después de SUSTENTADA Y APROBADA LA TESIS elaborado por el Bachiller en Ingeniería Agroindustrial: DAVID HUAMÁN GASTELÚ; para optar el TITULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL, acordando calificarlo con la NOTA de:

Diecisiete
(LETRAS)

(17)
(NÚMEROS)

Lima, 21 de diciembre del 2018

Dr. Rubén Alfredo Palomino Infante
Presidente

Ing. Pero José Romero Y Otiniano
Membro

Ph.D. Waldir Desiderio Estela Escalante
Asesor

Ph.D. Jorge Ernesto Guevara Vasquez
Director de la EP de Ingeniería Agroindustrial



Agradecimientos

Nuestros eternos agradecimientos a nuestros padres, que son los principales promotores de nuestros sueños, gracias a ellos por confiar en nosotros y en nuestras expectativas, gracias a nuestros hermanos (as), por apoyarnos incondicionalmente en este proyecto personal, por su tiempo y consejos, gracias a todos por estar presentes en los momentos más difíciles y más felices de nuestras vidas, gracias por todo su eterno amor.

Seguidamente agradecer a nuestro asesor, Dr. Ing. Waldir Desiderio Estela Escalante, que confió en nosotros y nos guio en este camino tan difícil, fueron tantos obstáculos que sin la ayuda de sus consejos este proyecto no se hubiese realizado.

Agradecimiento especial a nuestra Universidad Nacional Mayor de San Marcos por acogernos en sus aulas y brindarnos grandes maestros que participaron en toda nuestra formación profesional.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
NOTACINES	10
I. INTRODUCCIÓN	12
II. MARCO TEÓRICO	15
2.1. Generalidades sobre los biorreactores	15
2.2. Biorreactor Airlift	16
2.3. Clasificación de Biorreactores “Airlift”	20
2.4. Principios de Diseño y Configuración de Biorreactores Airlifts	25
2.5. Fenómenos de transporte: transferencia de masa en la operación de biorreactores airlift.	33
2.6. Fenómenos de transporte: transferencia de calor en la operación de biorreactores airlift.	38
2.7. Tiempo de homogenización o mezclado (θ_m).	40
2.8. Retención de gas (Φ).	41
2.9. Efecto de la configuración del biorreactor airlift en el nivel de líquido.	42
2.10. Aplicaciones de los biorreactores airlift en bioprocesos.	42
2.11. Principios generales de producción de cerveza.	43
III. MATERIALES Y MÉTODOS	55
3.1. Diseño del biorreactor airlift.	55
3.2. Construcción y ensamblado.	55
3.3. Evaluación del comportamiento hidrodinámico del biorreactor airlift.	56
3.4. Validación del biorreactor airlift en procesos de fermentación alcohólica.	57
3.5. Análisis químicos de las muestras de mosto fermentado.	59
3.6. Determinación de nitrógeno amino libre.	59
3.7. Determinación de etanol.	60
3.8. Evaluación de la viabilidad celular.	60
3.9. Evaluación sensorial de las cervezas producidas	60

3.10 Diseño de experimentos y análisis estadístico	61
IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	62
4.1. Diseño y ensamblaje del biorreactor “airlift”.	62
4.2. Evaluación del comportamiento hidrodinámico del biorreactor airlift en agua bidestilada	65
4.3. Evaluación del comportamiento hidrodinámico del biorreactor airlift utilizando jarabe de glucosa	73
4.4. Validación del biorreactor airlift en procesos de fermentación de cerveza	81
4.5 Análisis de evaluación sensorial	87
V. CONCLUSIONES	88
VI. RECOMENDACIONES	90
VII. BIBLIOGRAFÍA	91
VIII. ANEXOS	97

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Biorreactor de Agitación mecánica	15
Figura 2. Biorreactor “airlift” ó bucle interno	16
Figura 3. Dimensiones h, H, hd, A1, A2, Dr y Dd del biorreactor Airlift	17
Figura 4. Configuración de un biorreactor “airlift” ó bucle externo.	21
Figura 5. Configuración de biorreactores airlift de bucle interno.	22
Figura 6. Regímenes de circulación en un biorreactor airlift de bucle interno	23
Figura 7. Configuración de un biorreactor airlift de bucle interno inverso.	24
Figura 8. Configuración de un biorreactor airlift con baffle.	25
Figura 9. Distancia entre el difusor y el límite inferior del tubo interno.	26
Figura 10. Distancia entre el límite superior del tubo interno y el límite superior de la zona de descenso.	27
Figura 11. Difusores estáticos: plato poroso (a), de orificio (b), placa perforada (c).	28
Figura 12. Difusores dinámicos: a) boquilla de dos orificios; b) boquilla de cuatro orificios; c) anulares.	28
Figura 13. Diseños del separador de gas para biorreactores airlift.	30
Figura 14. Relación entre K_{La} y la velocidad superficial de gas (U_{GR}) en el tubo interno, para diferentes tipos de fluidos.	32
Figura 15. Gradiente de concentración para la transferencia de materia en un sistema líquido-sólido	33
Figura 16. Interface entre dos sistemas inmiscibles.	35
Figura 17. Etapas en la transferencia de oxígeno desde las burbujas de gas hasta las células.	37
Figura 18. Curva típica para determinar el tiempo de homogenización por el método del pulso de pH	41
Figura 19. Lúpulo en tres formatos, pellets, plugs y flores secas	48
Figura 20. Diagrama de flujo de la elaboración de cerveza	49
Figura 21. Montaje del sistema de trabajo que incluye el biorreactor “airlift”.	64

Figura 22. Superficie de respuesta del tiempo de homogenización en función al flujo de aire y relación de áreas (A_r/A_d)	67
Figura 23. Superficie de respuesta del efecto de A_r/A_d y la distancia entre el difusor y el tubo de ascenso en el tiempo de homogenización.	68
Figura 24. Superficie de respuesta del efecto del flujo de aire y distancia entre el difusor y tubo de ascenso (riser) en el tiempo de homogenización.	69
Figura 25. Superficie de respuesta del efecto de la relación A_r/A_d y la distancia entre el difusor y el tubo de ascenso en el K_{La} .	71
Figura 26. Superficie de respuesta del efecto de la relación A_r/A_d y el flujo de aire en el K_{La} .	72
Figura 27. Superficie de respuesta del efecto del flujo de aire, la distancia entre el difusor y el tubo de ascenso y la relación A_r/A_d en el tiempo de homogenización.	76
Figura 28. Superficie de respuesta del efecto de la relación de áreas (A_r/A_d) y el flujo de aire en el K_{La} .	79
Figura 29. Superficie de respuesta del efecto de la relación de áreas A_r/A_d y distancia entre el difusor y el tubo de ascenso en el K_{La} .	80
Figura 30. Fermentación de mosto de malta (14 °Plato) en matraces. Cinética de consumo de azúcares y producción de etanol (a) y consumo de nitrógeno amino libre y viabilidad celular (b).	83
Figura 31. Cinética de consumo de azúcares reductores (a), producción de etanol (b), consumo de nitrógeno amino libre (c) y células viables (b) en fermentaciones realizadas con mostos de diferentes concentraciones de sólidos solubles.	86

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Relaciones dimensionales de biorreactores airlift de bucle interno.	17
Tabla 2. Composición química de una cerveza comercial (Sanchis et al., 2000)	43
Tabla 3: Valores mínimos y máximos de las variables de entrada consideradas en el diseño experimental.	56
Tabla 4. Matriz experimental mostrando las variables de entrada y el tiempo de homogenización en experimentos realizados con agua bidestilada.	66
Tabla 5. Matriz experimental mostrando las variables de entrada y el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La}) en experimentos realizados con agua bidestilada.	70
Tabla 6. Matriz experimental mostrando las variables de entrada y el tiempo de homogenización en experimentos realizados con jarabe de glucosa a 14 °Brix.	74
Tabla 7. Matriz experimental mostrando las variables de entrada y en K_{La} en experimentos realizados con jarabe de glucosa a 14 °Brix.	78
Tabla 8. Resultados de la evaluación sensorial afectiva de la cerveza producida experimentalmente	85
Tabla 9. Resultados de la evaluación sensorial afectiva de la cerveza producida experimentalmente	87

RESUMEN

Se ha diseñado y construido un biorreactor airlift de 10L de acero inoxidable con la finalidad de utilizarlo en procesos fermentativos tales como en la producción de cerveza. El diseño se realizó tomando en consideración los criterios técnicos para biorreactores de agitación neumática como son: el número de aspecto (HL/D), relación entre áreas A_r/A_d , volumen y geometría de la zona de desgasificación, configuración del sistema de aireación, volumen de trabajo y geometría de la base. Una vez construido, el diseño y la configuración se evaluaron en pruebas de laboratorio antes de utilizarlo en experimentos de fermentación. Estos incluyeron el efecto de la relación A_r/A_d , flujo de aire (vvm) y distancia entre el difusor de aire y el tubo de ascenso (cm) en el tiempo de homogenización (Θ) y el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La}). Se ha utilizado un difusor microporoso de 2 μm de diámetro de material sintético. Asimismo, se han utilizado dos medios líquidos: agua bidestilada y jarabe de glucosa de 14 °Brix. El tiempo de homogenización se ha determinado por el método del “pH” adicionando una solución de NaOH 2N y midiendo la variación con un pH-metro. El coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{La}) se determinó por el método “gassing-out” utilizando una sonda de oxígeno disuelto. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (20 °C). Los resultados mostraron que el incremento del flujo de aire, la relación A_r/A_d y la disminución del espaciamiento entre el difusor de aire y el tubo de ascenso resulta en la disminución del tiempo de homogenización y el incremento del K_{La} . Asimismo, el incremento de la densidad del fluido incrementa sustancialmente el tiempo de homogenización mientras que los valores de K_{La} son mínimamente afectados. Subsecuentemente se realizaron experimentos de fermentación con mosto de malta de 14 y 20 °Brix configurando el biorreactor de la siguiente manera: relación $A_r/A_d = 0.8$, distancia del difusor de aire al tubo de ascenso de 2 cm y flujo de aire de 0.13 vvm y se evaluó la cinética de consumo de azúcares reductores, nitrógeno amino libre, producción de etanol y crecimiento celular. Los resultados mostraron un menor rendimiento de etanol, mayor consumo de nitrógeno amino libre y mayor tasa de crecimiento celular provocado por el suministro de aire, comparado con experimentos realizados estáticamente en matraces a condiciones similares. Finalmente, se evaluó sensorialmente la cerveza producida con mosto de 14 °Brix y se comparó con una cerveza artesanal comercial. Las cervezas producidas tuvieron una mayor puntuación con respecto a los atributos de olor, sabor y color. Los resultados obtenidos en el presente estudio pueden servir para proponer futuras investigaciones en el campo de las fermentaciones utilizando biorreactores airlift.

ABSTRACT

A 10 L stainless steel airlift fermenter has been designed and constructed with the purpose of utilising in fermentative processes such as beer production. The design was made keeping in mind technical criteria used for fermenters of pneumatic agitation such as: aspect number, A_r/A_d ratio, volume and geometry of the degassing zone, aeration system configuration, working volume and geometry of the bottom part. Once constructed, It was evaluated the effect of A_r/A_d ratio, air flow (vvm) and the distance between the air diffuser and the riser on the homogenization time and the oxygen mass transfer coefficient (K_{La}). It has been utilized a microporous diffuser of 10 μm of diameter of synthetic material. As liquid media it was utilised bi-distilled water and a solution of glucose syrup of 14 °Brix. The homogenization time was determined by the pH method by adding a volume of 2N NaOH and measuring the variation with a pH-meter. The determination of the oxygen mass transfer coefficient (K_{La}) was determined by the “gassing-out” method utilising a dissolved oxygen electrode. All experiments were carried out at room temperature (20 °C). Results showed that the increase of air flow and A_r/A_d ratio and, the decrease of the distance between the air diffuser and riser provoked the decrease of the homogenization time and the increase of the K_{La} values. Likewise, the increase of the medium density resulted in a markedly increase of the homogenization time while the K_{La} values were almost not affected. Subsequently, it was performed fermentation experiments with malt wort of 14 and 20 °P. The fermenter was configured as follows: $A_r/A_d = 0.8$, distance between the air diffuser and the riser= 2 cm and, air flow=0.13 vvm. It was evaluated the kinetics of sugars and free amino nitrogen consumption, ethanol production and viable cell growth. Results showed a lower ethanol yield, higher consumption of free amino nitrogen and higher cell growth rate provoked by the air supply as compared to experiments carried out in statically Erlenmeyer flasks under similar cultivation conditions. Finally, the beer produced with malt worth of 14 °Brix was sensory evaluated and the results compared to those of a commercial craft beer. The produced beers obtained a higher score in terms of smell, taste and colour. The results obtained in this study can be used to propose future researches in the field of fermentations utilising airlift bioreactors.

NOTACIONES

Símbolo	Definición
HL/D	Número de aspecto
HL	Altura del líquido
D	Diámetro del biorreactor
Ar/Ad	Relación de áreas entre el tubo de ascenso y descenso
v.v.m	Litros de aire/litros de sustrato*minuto
Θ, θ_m	Tiempo de homogenización
K_{La}	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno
Dd	Diámetro del Downcomer (Tubo de descenso)
Dr	Diámetro de Riser (Tubo de ascenso)
H	Altura del cuerpo del biorreactor
h	Altura del tubo interno
V	Volumen del biorreactor
F	Flujo de aire en vvm
UG/UGr	Velocidad superficial del gas
Lr/Ld	Relación de longitudes entre el tubo de ascenso y descenso.
Pg	Potencia mecánica para la inyección de gas
V_L	Volumen del líquido
ρ_L	Densidad del líquido
ρ	Densidad del mosto
g	Aceleración gravitacional
C_{Ai}	Concentración en la interface líquido-sólido
C_{A0}	Concentración en el seno del medio líquido
N_A	Velocidad volumétrica
a	Área interfacial líquido-sólido.
C^*_{AL}, C^*	Concentración de oxígeno en saturación
C_{AL}	Concentración de oxígeno en el medio
C_{i+1}	Concentración final de oxígeno en el medio
C_o	Concentración inicial de oxígeno
Q	Calor transferido o absorbido
U	Coefficiente de transferencia de calor general
A	Área (m^2)
ΔT	Diferencia de temperatura entre los medio y agua
h_o	Coefficiente de la película exterior
h_i	Coefficiente de la película interior
h_{of}	Coefficiente de película incrustante exterior
h_{if}	Coefficiente de la película incrustante interior
h_w	Coefficiente de transferencia de calor de la pared
k	Conductividad térmica de la pared
“X”, e	Espesor de la pared
w	Flujo de agua
$C_{p_{agua}}$	Calor específico del agua
s	Esfuerzo permisible
E	Eficiencia de la soldadura
Φ	Retención de gas
V	Velocidad del líquido

G,L,S	Gas, Líquido, Sólido
t_i	Tiempo inicial de medición de oxígeno
$t_{(i+1)}$	Tiempo final de medición de oxígeno

I. INTRODUCCIÓN

Los bioprocesos industriales que utilizan microorganismos se realizan en sistemas cerrados y controlados, esto asegura la asepticidad y la obtención de resultados esperados. Los bioprocesos más comunes están las fermentaciones alcohólicas realizadas por levaduras para la producción en bebidas fermentadas tales como cervezas, vinos, etc. La parte más importante en estos procesos fermentativos son los biorreactores en donde se lleva a cabo la conversión de los azúcares fermentables en etanol, CO_2 y una serie de compuestos químicos que determinan la calidad sensorial. En la producción de cerveza por ejemplo se utilizan biorreactores cilindro-cónicos instalados en ambientes aireados con la finalidad de facilitar el intercambio de calor. En la actualidad, con el propósito de mejorar los procesos de producción de cerveza en términos de rendimiento y productividad se ha estudiado el efecto de ciertos cambios en el diseño y configuración de biorreactores en la dinámica del fluido. Uno de los biorreactores que ha encontrado aplicación en los procesos de producción de cerveza es el de agitación neumática como por ejemplo los biorreactores “airlift”, los cuales tienen algunas ventajas en comparación con los de agitación mecánica.

En el diseño de biorreactores “airlift” el aspecto más importante es comprender el comportamiento hidrodinámico del sistema el cual está influenciado por su geometría, flujo de aire, tipo de aspersor o difusor de aire, tamaño del poro del difusor, distancia entre el difusor de aire y el tubo interno, distancia entre la parte superior del tubo interno y el nivel de medio utilizado, relación de áreas transversales de la zona de ascenso y descenso (A_r/A_d), así como también la relación entre longitudes del tubo interno y el cuerpo de biorreactor. Los aspectos que explican el comportamiento hidrodinámico son el volumen de gas retenido, velocidad de circulación del líquido, transferencia de calor, el coeficiente de transferencia de masa del oxígeno (K_{La}) y el tiempo de homogenización (θ_m) (Chisti, 1989). De todos ellos, el K_{La} es particularmente importante ya que se utiliza como un parámetro importante para el escalamiento.

El diseño y configuración de los biorreactores “airlift” son muy diferentes a los biorreactores convencionales “estándar” de agitación mecánica. Estos biorreactores no tienen dispositivos internos móviles que agiten el medio de fermentación y además son sencillos de operar. Debido a esto generan una menor fuerza de cizallamiento comparado a los biorreactores de agitación mecánica; esto es particularmente favorable en el caso del cultivo de células

susceptibles al daño mecánico causado por el esfuerzo cortante, el cual es provocado por el movimiento del fluido y partes internas móviles del biorreactor. Las levaduras debido a su mayor tamaño son más susceptibles al daño mecánico que las bacterias.

Entre los parámetros más usados para explicar el comportamiento hidrodinámico de los biorreactores “airlift” están el tiempo de homogenización (θ_m) y el coeficiente volumétrico de transferencia de masa de oxígeno (K_{La}). Estos dos criterios son particularmente importantes en procesos fermentativos, por una parte, el tiempo de homogenización brinda información sobre el tiempo en el que la composición química del medio de fermentación se mantiene homogénea a pesar de los cambios ocasionados por la actividad fermentativa de las levaduras y, por otro lado, el K_{La} , indica cuan eficiente es la entrega de oxígeno desde las burbujas de aire a las células contenidas en el biorreactor.

En la práctica se buscan diseños y configuraciones de biorreactores que disminuyan el tiempo de homogenización e incrementen la performance de la entrega de oxígeno a la célula (K_{La}). Así, estudios realizados hasta el momento han utilizado incluso sistemas computacionales para evaluar por ejemplo la influencia que tiene el tamaño de la burbuja del aire sobre estos dos parámetros. Mahmood (2015), demostró que las burbujas de aire de 50 nm de diámetro aumentan el área interfacial de transferencia de masa de oxígeno y también el tiempo de residencia de la burbuja en el sistema. Por otro lado, al trabajar con flujos de aire de 300 mL/min, las burbujas incrementan la velocidad de circulación del líquido y como resultado mejora el mezclado. Otros estudios evaluaron la influencia que tiene la geometría del biorreactor “airlift” y el arreglo del sistema en su operatividad. Por ejemplo, Klein et al (2003), diseñó y configuró un biorreactor “airlift” de 50 L con una zona de degasificación en forma cilindro-cónica con un ángulo de 51° y operado a flujos de aire entre 0.1 a 1.4 vvm. Los resultados mostraron que, al incrementar la relación de área (A_r/A_d) y la concentración de sólidos solubles en el medio de cultivo incrementa la velocidad superficial mínima necesaria para que ocurra la circulación del medio. Esto es particularmente importante ya que permite conocer el efecto que provoca modificar el diámetro del tubo interno en la hidrodinámica del fluido contenido en este tipo de biorreactores y su aplicabilidad en procesos fermentativos. Asimismo, se demostró que una relación $A_r/A_d < 1.0$ es necesario cuando se trabaja con medios con una alta concentración de sólidos solubles a fin de evitar problemas de estancamiento. Sin embargo, al incrementarse la relación de áreas A_r/A_d , incrementa el consumo de energía (fuerza motriz) y también las pérdidas de energía por fricción, debido en parte a la cantidad de burbujas

que entran a la sección de descenso aumenta. Por el contrario, al disminuir la relación de áreas disminuye las pérdidas por fricción y la fuerza motriz necesaria para el movimiento.

En los procesos de fermentación de cerveza la elección y el diseño del biorreactor es un aspecto importante a tomar en cuenta si se desea optimizar el proceso. Esto implica disminuir el tiempo de fermentación, mejorar el rendimiento de etanol y el consumo de azúcares sin afectar la producción de compuestos de importancia sensorial que alteren la calidad del producto. En esta investigación se propone diseñar y construir un biorreactor “airlift” con el propósito de utilizarlo en la fermentación de cerveza.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades sobre los biorreactores

Los biorreactores son sistemas cerrados en donde se cultivan células y microorganismos a condiciones específicas para producir un componente de interés mientras se controla los parámetros de operación. Se utilizan en la producción de ácidos orgánicos, vitaminas, fermentación alcohólica, tratamiento de aguas residuales, antibióticos, metabolitos secundarios, entre otros. Los biorreactores industriales se construyen por lo general de acero inoxidable debido a su alto grado de maleabilidad y acabado sanitario que es posible conseguir. A nivel laboratorio o escala piloto los materiales que se usan para construir biorreactores además de acero inoxidable incluyen plásticos, vidrio y materiales sinterizados (Behme, 2009; Mauter, 2009).

Los biorreactores de agitación mecánica (Figura 1) son ampliamente utilizados en muchos bioprocesos industriales. Se caracterizan por tener un sistema de agitación constituido por un eje ensamblado verticalmente y acoplado por la parte externa a un motor eléctrico y por el otro extremo impulsores de diferentes geometrías que dan movimientos al medio de fermentación. Otros componentes son los cortacorrientes, difusor de aire, puerto de muestreo, etc. Estos biorreactores debido al sistema de agitación que usan, generan alta fuerza de cizalla además consumen mucha energía.

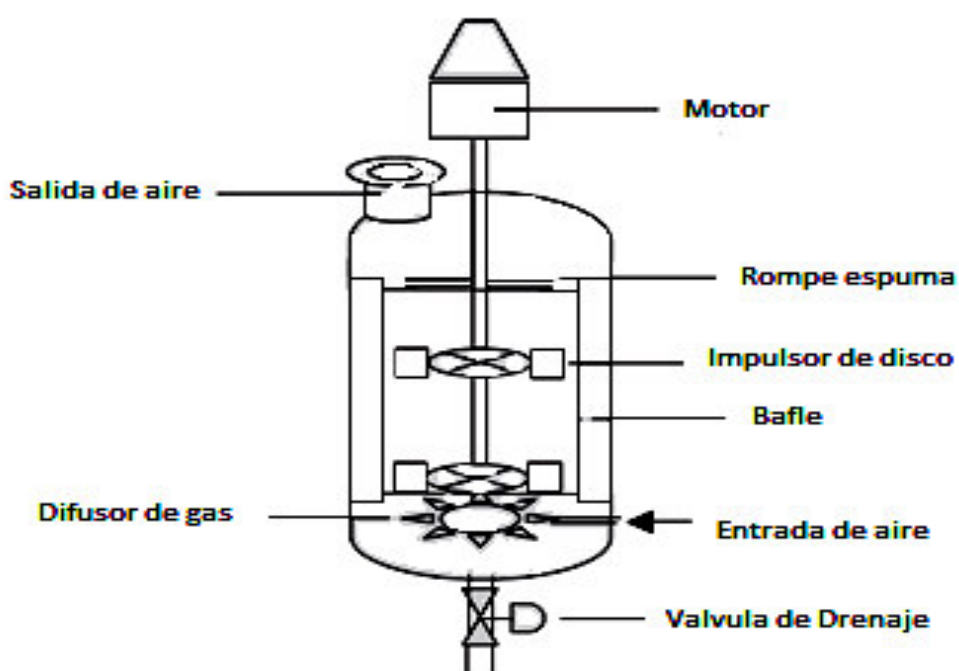


Figura 1. Biorreactor de agitación mecánica

2.2. Biorreactor airlift

Los biorreactores “airlift” tienen un diseño simple, bajo costo de operación, mantenimiento y construcción y se utilizan en procesos fermentativos en donde los microorganismos son muy sensibles al daño mecánico provocado por fuerzas de cizalla. El biorreactor “airlift” consta de una zona de ascenso de fluido (tubo interno), una zona de descenso, desgasificación y una zona inferior de base plana o cónica. Entre los accesorios ensamblados al biorreactor se tiene un difusor por donde se genera las burbujas de aire, un tubo interno (riser), puertos de toma de muestra y acoplamientos de electrodos (pH, oxígeno disuelto) entre otros (Figura 2).

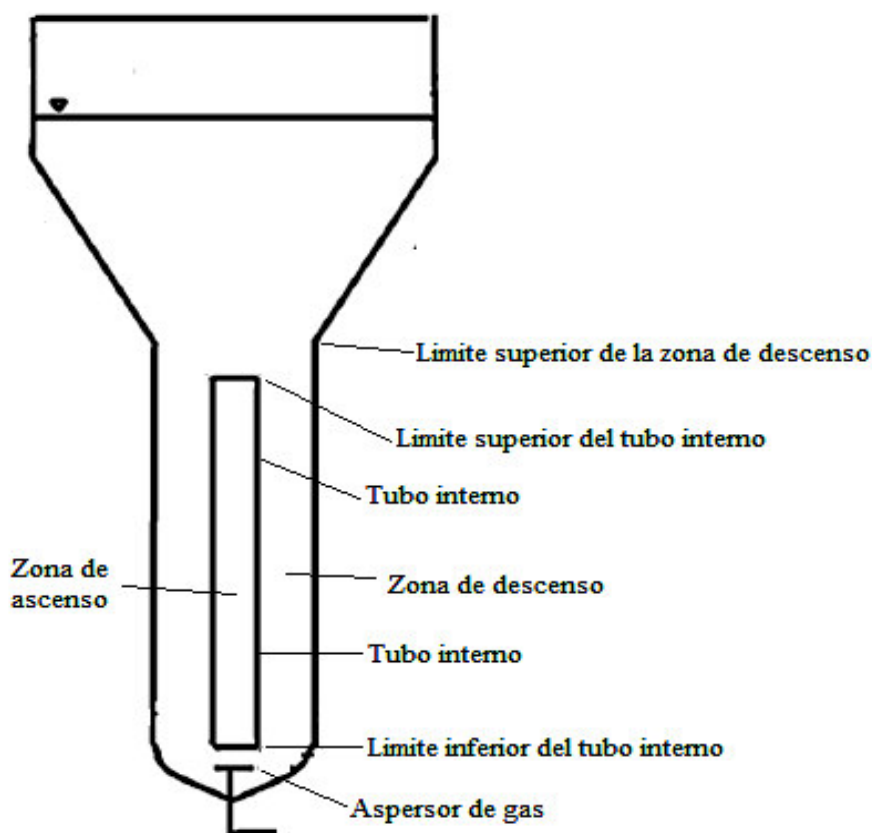


Figura 2. Biorreactor “airlift” o de bucle interno

El funcionamiento del biorreactor “airlift” se basa en la formación de un sistema gas-líquido-sólido y la circulación del medio se realiza a través de un tubo concéntrico (Merchuk et al., 2010). El propósito de la configuración óptima de estos sistemas es que las células estén en contacto de manera eficiente con los nutrientes del medio y el oxígeno. Con respecto al diseño y construcción, se ha reportado información sobre el dimensionamiento de biorreactores “airlift” (Tabla 1).

Tabla 1. *Relaciones dimensionales de biorreactores airlift o de bucle interno*

Dimensión	Juraščík et al., 2006	Choi et al., 1995	Russell et al., 1994	Mahmood et al., 2015	Luo et al., 2011	Klein et al., 2003
H (m)	3.03	2.137	4.11	0.49	1.3	-
h (m)	2.7	1.286	3.22	0.14	0.82	1.2
Dd (m)	0.294	0.456	0.410	0.20	0.284	1.42
Dr (m)	0.2646	0.3192	0.205	0.12	0.16	0.36
A1	0°	0°	0°	0°	0°	51°
A2	0°	60°	90°	25°	20°	51°
Hd (m)	0.195	0.497	0.89	0.195	0.48	-
Ar/Ad	0.9	0.7	0.5	0.6	0.57	0.25
F (vvm)	-	0.41-3.35	0.5-3.31	0.08	0.03	0.04-1.4
V (m ³)	0.195	0.1	0.09 a 0.25	0.008-0.009	0.07	0.05

H: altura del cuerpo del biorreactor (m), h: altura del tubo interno (m), D: diámetro del biorreactor (m), A1: ángulo del cono superior, A2: ángulo del cono inferior, hd: altura del desgasificador (m), Ar/Ad: relación de áreas entre la zona de ascenso (riser) y la zona de descenso, F: flujo de aire en vvm y V: volumen de trabajo (m³).

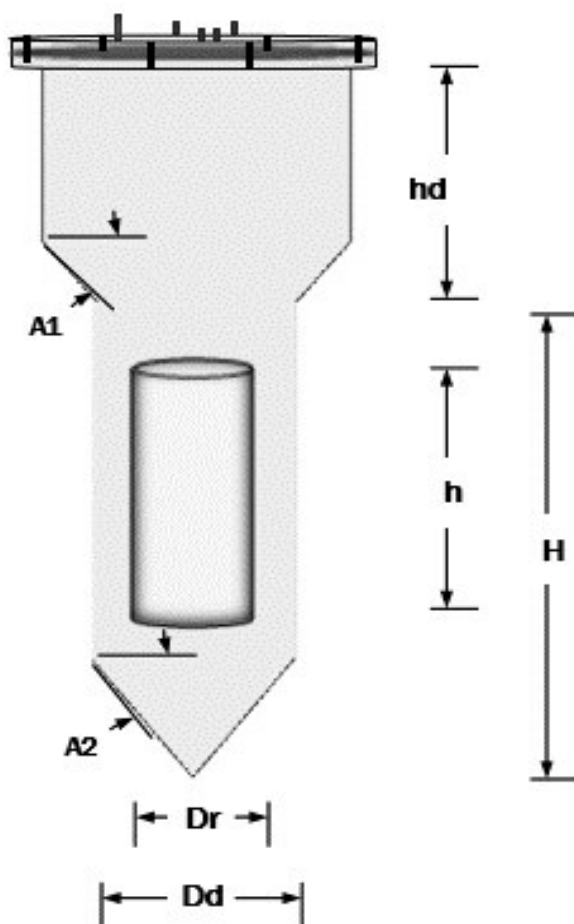


Figura 3. Dimensiones h, H, hd, A1, A2, Dr y Dd de un biorreactor Airlift

2.2.1. Zona de ascenso del fluido (riser)

Es la zona formada por el flujo vertical del medio que atraviesa el tubo interno. El movimiento del líquido es provocado por la presión de descarga del aire a través del difusor y por la variación de la densidad del líquido producto de la transferencia de oxígeno desde las burbujas al medio. El gas se inyecta a presión por la parte inferior del tubo interno y en su ascenso se transfiere oxígeno desde las burbujas y a la vez arrastra el líquido hacia la parte superior. En este caso, la velocidad del gas es generalmente mayor que la del líquido. Cuando el tamaño de las burbujas es muy pequeño existe un flujo uniforme entre la fase líquida y gaseosa resultando en velocidades de ascenso iguales. Se han descrito diferentes regímenes de movimiento del medio líquido con referencia a burbujas de aire, de ellos sólo dos son de interés en los biorreactores “airlift” (Merchuk et al., 2009 y Merchuk et al., 1990):

- a. Régimen homogéneo: resulta cuando las burbujas son de diámetro pequeño, uniformes y con una turbulencia baja.
- b. Régimen turbulento: resulta cuando coexisten burbujas de diferentes tamaños dentro de un régimen turbulento producto del incremento del flujo de aire que se inyecta al biorreactor.

La zona de ascenso (riser) está limitada por las paredes del tubo interno cuyo ratio de aspecto puede variar desde las relaciones 4.8:1 a 10.3: 1 (definida como la relación de la altura del tubo de ascenso (h) con respecto al diámetro del cuerpo del biorreactor (D_d)), las cuales son más usadas. Este intervalo proporciona una buena representación de las relaciones de aspecto del biorreactor airlift a escala industrial (Russell et al., 1994).

2.2.2. Zona de descenso del fluido (downcomer)

Es la zona formada por el flujo vertical descendente de medio comprendido entre el cuerpo del biorreactor y el tubo interno. El fluido que es impulsado por la zona de ascenso es luego direccionado hacia la parte inferior del biorreactor para luego ser recirculado nuevamente. La fuerza motriz que provoca la recirculación del medio es la diferencia de densidades del fluido ascendente y descendente. La variación de densidades se debe primero a la transferencia de oxígeno al fluido, el cual incrementa su volumen, y segundo a la expulsión parcial en la zona de desgasificación o su consumo por los microorganismos. Esta diferencia de densidades genera un gradiente necesaria para la recirculación del líquido. En la configuración del sistema es

importante considerar la velocidad del líquido en la zona de ascenso, ya que debe ser mayor a la velocidad de ascenso de las burbujas de aire para que estas puedan ser direccionadas hacia la zona de descenso. Sin embargo, si el flujo de aire desde el difusor es muy bajo, resultará en una baja velocidad superficial del líquido y consecuentemente las burbujas se liberarán en el separador de gas y sólo circulará líquido en la zona de descenso.

La zona de descenso está limitada por el tubo interno y la pared del biorreactor. La relación entre el área transversal de la zona de ascenso (raiser) y el área transversal de la zona de descenso (downcomer) para este tipo de biorreactores varía entre 0.4 a 0.8 en sistemas de alta densidad celular para lograr una distribución de sólidos uniforme (Klein et al., 2003).

2.2.3. Zona de degasificación

Es la zona ubicada en la parte superior del biorreactor en donde se produce la eliminación parcial del oxígeno, CO₂ y otros gases contenidos en el medio de cultivo. Esto es particularmente importante en los procesos fermentativos en donde se busca eliminar el CO₂ producido por el metabolismo de microorganismos. La zona de degasificación es también importante ya que permite la acumulación de la espuma generada durante el cultivo.

Las características de la zona de degasificación (diámetro y altura), la configuración del tubo interno en el biorreactor, viscosidad del medio entre otros parámetros tiene un efecto importante en la velocidad de eliminación de gas. Asimismo, el separador de gas tiene influencia significativa en la dinámica de fluidos en los biorreactores. El diseño del separador de gas determina la magnitud de la degasificación del fluido que asciende desde la parte inferior del biorreactor a través del tubo interno (Siegel et al., 1991, Klein et al., 2003). En el caso que sea necesario una degasificación completa como por ejemplo la eliminación de CO₂ que puede afectar el metabolismo celular, es común agrandar o elongar la sección del separador de gas con la finalidad de reducir la velocidad del líquido y facilitar una mejor degasificación del medio. De acuerdo a la literatura el diámetro del separador de gas comúnmente utilizado es igual al del tubo de descenso. Adicionalmente, se ha reportado la utilización de una zona de separación cónica con diámetro mayor a la del tubo de descenso ya que ayuda a una mejor sedimentación y degasificación del medio en sistemas líquido-sólido-gaseosa (Klein et al., 2003).

2.2.4. Zona inferior del biorreactor

Esta zona está comprendida por la base del biorreactor en donde el fluido es descargado para luego ser nuevamente recirculado a través del tubo interno. Generalmente es de forma cónica y forma un ángulo entre 75 a 45 °C con el cuerpo del biorreactor (Maule, 1996). Esta geometría es particularmente importante desde el punto de vista tecnológico ya que permite que las células (levaduras) sedimenten en el fondo del tanque facilitando su evacuación luego del proceso de fermentación. Sin embargo, desde el punto de vista de la hidrodinámica del fluido presenta algunas limitaciones que influyen en el tiempo de homogenización y la transferencia de oxígeno en esta zona del fermentador. En esta parte se instala el difusor de gas por donde se descarga aire, oxígeno u otro gas que sirva para mover el medio de cultivo y facilitar su homogenización y la transferencia de calor del sistema (Siegel y Robinson, 1992; Guieysse et al., 2011). Esta zona tiene una importante repercusión en aspectos como la retención de gas en el volumen del líquido, la velocidad del líquido, la performance en la transferencia de oxígeno, la homogenización e incluso en la viabilidad de los microorganismos contenidos en el medio de cultivo (Merchuk et al., 1994; Luo et al., 2011).

2.3. Clasificación de los biorreactores “airlift”

Se clasifican de acuerdo a como se configuran las zonas de ascenso y descenso y a la presencia de tubos internos u otro tipo de dispositivos que permiten el direccionamiento y movimiento del medio de cultivo para optimizar el tiempo de homogenización y la transferencia de oxígeno. Entre ellos se tienen:

2.3.1. Biorreactores airlift de bucle externo

Este tipo de biorreactores están compuestos de dos cilindros de diferente diámetro conectados entre sí por dos tubos, uno en la parte superior y otro en la parte inferior (Figura 4). El cilindro de mayor diámetro representa la zona de descenso del fluido mientras que el de menor diámetro la zona de ascenso y es la de mayor transferencia de oxígeno. El difusor de aire se encuentra ubicado en la parte inferior del tubo de menor diámetro. En términos generales presentan una mayor área de desgasificación debido a que los tubos de ascenso y descenso están separados y cada uno tiene un área de desgasificación específica. Los principios que determinan el movimiento entre estas zonas son los mismos para todos los biorreactores “airlift”. En estos

sistemas la diferencia entre las zonas de ascenso y descenso es mucho mayor lo que resulta en un mayor movimiento del fluido y por ende un menor tiempo de circulación y homogenización comparado a los biorreactores de bucle interno (Doran, 1995). Estos biorreactores son utilizados en la producción de microalgas (Fernández et al., 2001), producción de poligalacturonasas por *Aspergillus oryzae* (Fontana y Silveira, 2012), producción de gluconato de calcio (Bao et al., 2004) entre otros.

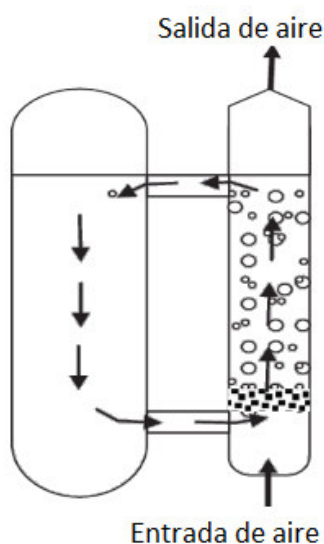


Figura 4. Configuración de un biorreactor “airlift” de bucle externo

En los biorreactores de bucle externo la circulación del líquido puede controlarse mediante válvulas conectadas en las secciones que conectan los tubos de ascenso y descenso, sin embargo, la tasa de transferencia de masa se ve afectada comparado con los biorreactores airlift de bucle interno (Chisti, 1989; Doran, 1995).

2.3.2. Biorreactores airlift de bucle interno

Están compuestos de dos cilindros concéntricos que determinan la zona de ascenso y descenso del sistema (Figura 5). Los biorreactores airlift son los más estudiados y de mayor aplicación industrial. En ellos se pueden cultivar levaduras, hongos filamentosos, bacterias, microalgas, etc. La diferencia de densidades entre la zona de ascenso y descenso resultado de la incorporación de gas en el medio de cultivo provoca la circulación líquido, el cual tiene un efecto importante en el mezclado, la circulación de burbujas, la suspensión de sólidos y la

retención de gases (Klein et al., 2003). Adicionalmente, en términos generales en este tipo de biorreactores la distribución de fuerza de cizallamiento es homogénea y menor comparado a los biorreactores de agitación mecánica (Oldshue, 1983; Siegel et al., 1992; Merchuk et al., 2010).

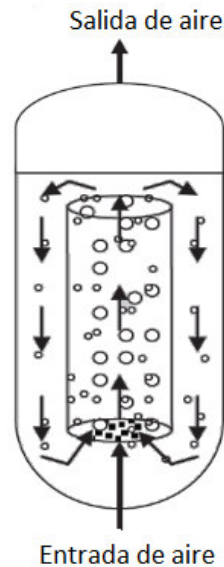


Figura 5. Configuración de biorreactores “airlift” de bucle interno

Con la finalidad de mejorar algunas características de estos biorreactores se han hecho modificaciones en su diseño, como por ejemplo, se ha incorporado una sección de degasificación de mayor área y en algunos casos se modificó la base del biorreactor hasta alcanzar una geometría cónica. También se ha modificado la geometría del tubo interno con la finalidad de incrementar la fuerza de cizallamiento.

2.3.2.1. Regímenes de circulación del medio en los biorreactores airlift de bucle interno

En los biorreactores airlift existen tres regímenes que determinan la velocidad global de circulación (Figura 6). Estos regímenes están basados en mediciones y observaciones visuales del comportamiento de la fase gaseosa en la zona de descenso. El comportamiento de la circulación está influenciado por el flujo de aire que se inyecta al sistema por el tubo interno (Heijnen et al., 1997).

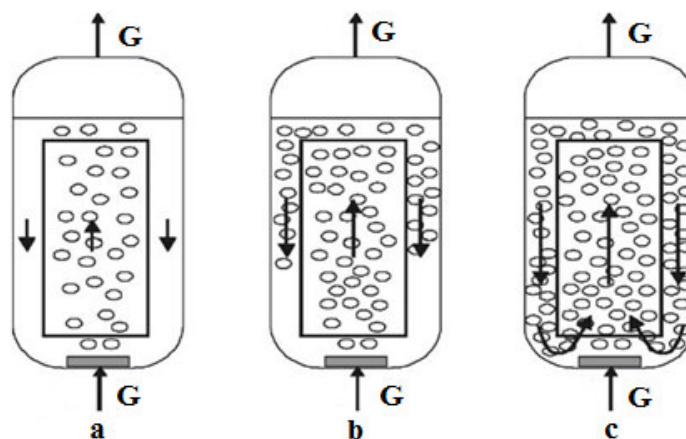


Figura 6. Regímenes de circulación en un biorreactor airlift de bucle interno

Un primer régimen (Figura 6a) se caracteriza por la ausencia de burbujas de gas en la zona de descenso debido a una velocidad superficial de gas (U_G) pequeña, es decir, la velocidad del líquido que se genera es insuficiente para arrastrar las burbujas hacia la zona de descenso. En un segundo régimen (Figura 6b), las burbujas avanzan gradualmente y se estancan en la zona de descenso, a medida que aumenta la velocidad superficial de gas y la velocidad del líquido de la zona de descenso se iguala a la velocidad total de las burbujas. En el tercer régimen (Figura 6c) sucede la recirculación de las burbujas a altos flujos de aire, la velocidad del líquido en la zona de descenso es suficientemente alto para la recirculación de las burbujas (arrastrados desde la zona de desgasificación hacia la zona de descenso).

2.3.3. Biorreactores airlift de bucle interno inverso

Estos biorreactores se caracterizan por presentar dos difusores de gas ubicados en el espacio entre el tubo interno y el cuerpo del biorreactor (Figura 7). La configuración es diferente comparado al biorreactor de bucle interno simple. En este tipo de biorreactores el aire es descargado en forma de burbujas por los difusores, los cuales ascienden junto con el líquido hacia la zona de desgasificación mientras se produce el proceso de transferencia de oxígeno. El fluido desciende por el tubo interno hacia la parte inferior para luego ser recirculado nuevamente. En estos biorreactores la velocidad del líquido es mucho mayor y la retención de gas es generalmente similar a los biorreactores airlift de bucle interno (Kilonzo et al., 2006). En algunos casos se puede instalar un difusor de corona en lugar de dos difusores con la finalidad de mejorar el movimiento del medio de cultivo.

Las aplicaciones más comunes son en el tratamiento de aguas residuales y fermentaciones utilizando *Aspergillus Niger* (Allen y Robinson. 1989).

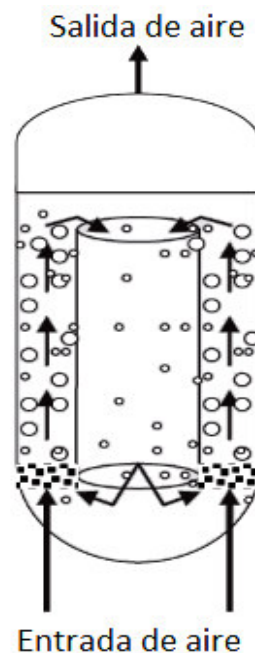


Figura 7. Configuración de un biorreactor airlift de bucle interno inverso

2.3.4. Biorreactores airlift con baffle

Se caracterizan por presentar un baffle plano dentro del biorreactor (Figura 8). El baffle puede ser colocado en el centro geométrico del cuerpo del biorreactor cuyo ancho es igual al diámetro del cilindro. El baffle divide al sistema en dos partes, por un lado se inyecta el gas en forma de burbujas a través de un difusor y ascienden hasta la zona de desgasificación. Luego, el fluido desciende por la parte adyacente hasta la parte inferior para ser nuevamente recirculado. En algunos casos, el baffle también puede ser instalado en una posición diferente al centro geométrico (diámetro) del cuerpo del biorreactor. En este caso, el volumen de la zona de ascenso puede aumentar o disminuir dependiendo de la posición en que se instale el baffle.

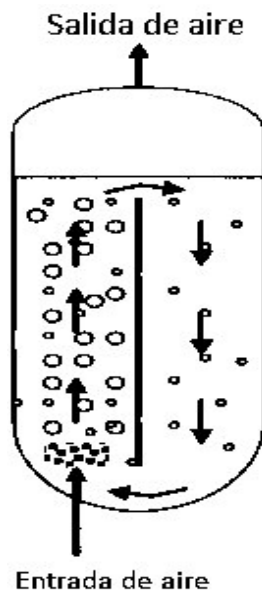


Figura 8. Configuración de un biorreactor airlift con bafle

2.4. Principios de diseño y configuración de biorreactores “airlift”

En la construcción de un biorreactor “airlift” se toman en cuenta ciertos criterios de diseño y parámetros de operación que influyen en el comportamiento hidrodinámico como por ejemplo; el coeficiente volumétrico de transferencia de masa de oxígeno (K_{La}) y el tiempo de homogenización. Entre los criterios de diseño y parámetros de operación se tiene:

- Distancia entre el difusor de gas y la base del tubo interno.
- Distancia entre el límite superior del tubo interno y el límite superior de la zona de descenso.
- Tipo de difusor de gas
- Geometría del cuerpo del biorreactor y zona de degasificación
- Relación entre el área de la sección transversal del tubo interno y de la zona de descenso (A_r/A_d).
- Relación entre la longitud del tubo interno y el tubo correspondiente a la zona de descenso.
- Flujo de gas (vvm).

2.4.1. Distancia entre el difusor de gas (aspersor) y el límite inferior del tubo interno (Bottom clearance)

La distancia entre el difusor de gas y el límite inferior del tubo interno (figura 9) influye en la caída de presión dinámica y la formación de zonas muertas cerca de la parte inferior del biorreactor, además influye en la sedimentación de sólidos (Cai et al., 1992). Según Merchuk et al (1994), una disminución de esta distancia incrementa la acumulación de gas tanto en la zona de ascenso como de descenso. Sin embargo, al disminuir la velocidad del líquido, la acumulación de gas en la zona de ascenso aumenta y disminuye en la zona de descenso ya que la velocidad del líquido está restringido por la caída de presión en el fondo del biorreactor, lo que ocasiona que casi todo el gas se desacople en la zona de desgasificación.

Por otro lado, al incrementar el flujo de aire que ingresa al sistema, conlleva a un incremento en la velocidad superficial del gas y una mayor acumulación de esta en la zona de ascenso y descenso, con un mayor tiempo de residencia. Sin embargo, la acumulación de gas en el tubo de descenso es casi nulo a valores bajos de velocidad superficial del gas. Adicionalmente, al disminuir la distancia entre el tubo interno y el difusor de gas e incrementar el flujo de aire, el valor de K_La tiende a incrementar (Kilonzo et al., 2007).

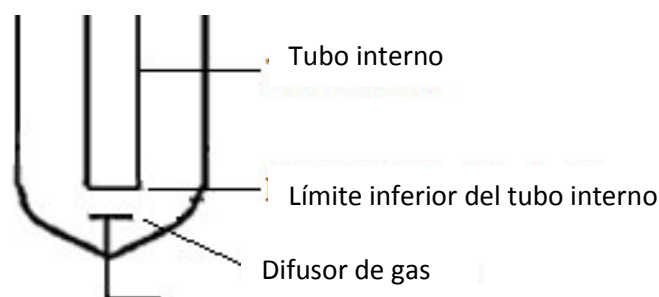


Figura 9. Distancia entre el difusor y el límite inferior del tubo interno

2.4.2. Distancia entre el límite superior del tubo interno y el límite superior de la zona de descenso (Top clearance)

De acuerdo a estudios realizados, la acumulación de gas en la zona de ascenso aumenta a medida que disminuye la distancia entre el límite superior del tubo interno y el límite superior de la zona de descenso (Figura 10), a su vez hay un aumento de gas en la zona de descenso. Por el contrario, si hay un incremento de la distancia entre el límite superior del tubo interno y el

límite superior de la zona de descenso genera una menor acumulación de gas en el tubo interno (Merchuk et al., 1994; Kilonzo et al., 2007). Asimismo, el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La}) incrementa a medida que la distancia entre el límite superior del tubo interno y el límite superior de la zona de descenso disminuye, conduce a una velocidad del líquido más alta y más burbujas son arrastradas. Pero, dado que el tamaño de las burbujas arrastradas son menores que el tamaño medio de la burbuja, el K_{La} aumenta más rápidamente debido al incremento del área interfacial. Por otro lado, si se incrementa la viscosidad de la solución a fermentar, ocasiona la coalescencia, generando un menor K_{La} por la menor área de contacto de las burbujas grandes de aire con la solución (Merchuk et al., 1994).

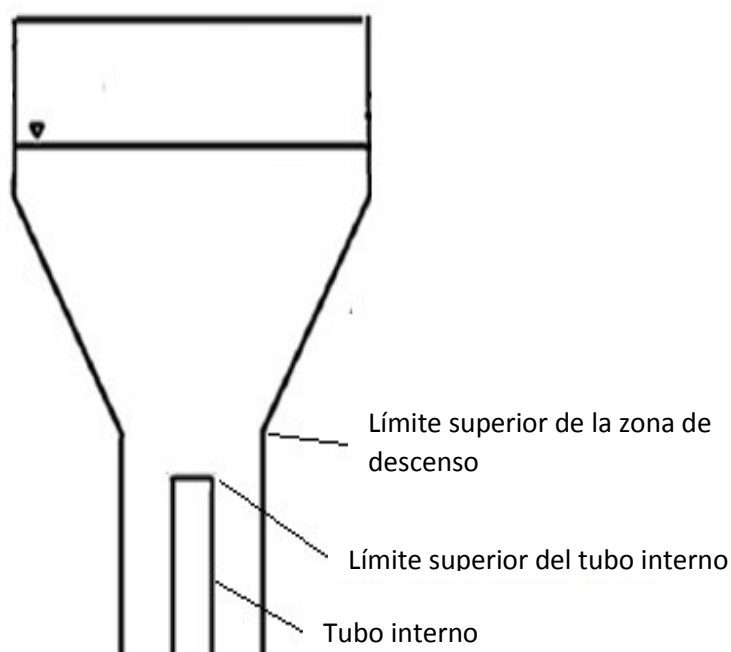


Figura 10. Distancia entre el límite superior del tubo interno y el límite superior de la zona de descenso

2.4.3. Tipo y geometría de los difusores de gas

Existen diferentes tipos de difusores de gas los cuales se dividen en estáticos y dinámicos (Figuras 11 y 12). Los difusores estáticos incluyen los de orificio y placa perforada y platos porosos. Los del tipo dinámico incluyen las boquillas de 2 y 4 orificios que dispersan el gas debido a la energía cinética provocada por un chorro de líquido y aspersores anulares (Chisti y Moo-Young, 1987; Luo et al., 2011). La elección del difusor depende de varios factores entre ellos el tamaño y número de poro, el costo, la facilidad de su limpieza, etc. Por

ejemplo, las placas perforadas y de orificio son de bajo costo mientras que los platos porosos son más caros y provocan mayores caídas de presión. Además, son susceptibles a obstrucciones y pueden ser un foco de contaminación (Chisti y Moo-Young, 1987).

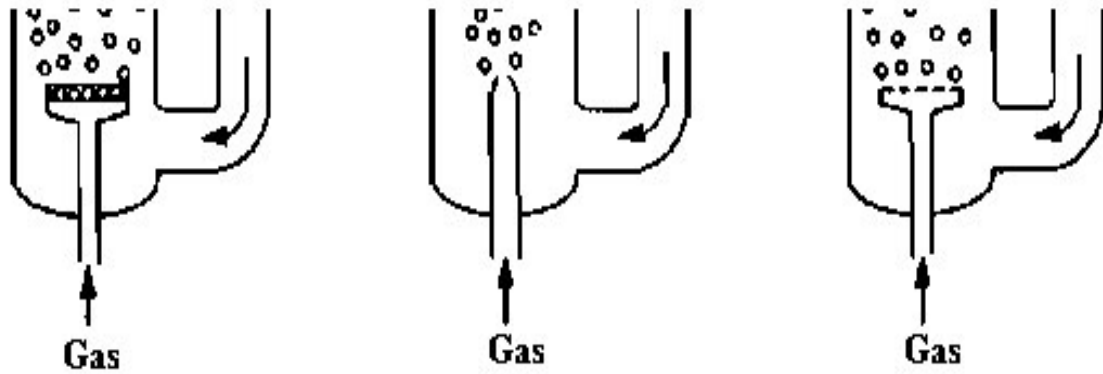


Figura 11. Difusores estáticos: plato poroso (a), de orificio (b), placa perforada (c)

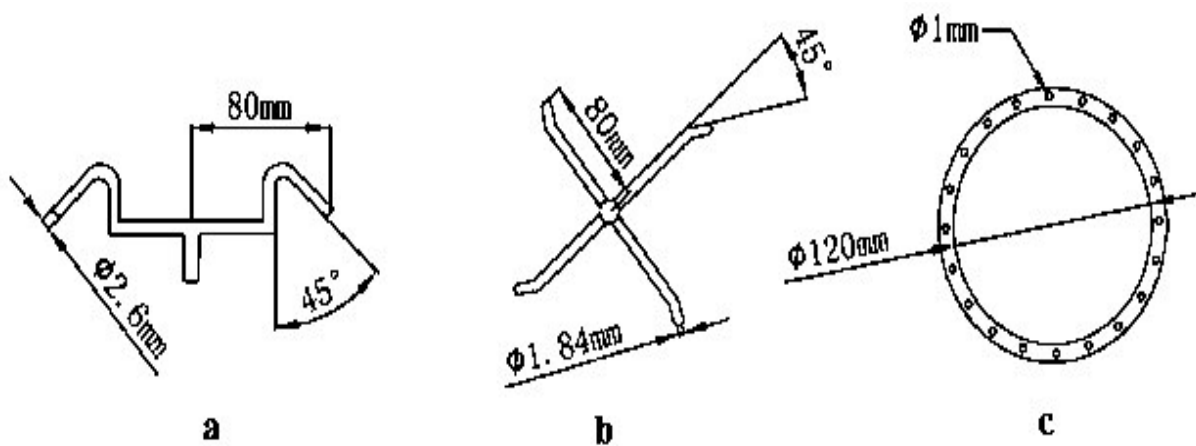


Figura 12. Difusores dinámicos: a) boquilla de dos orificios; b) boquilla de cuatro orificios; c) anulares

La geometría del difusor, así como el número y tamaño de agujeros influye en el tamaño de la burbuja, la velocidad superficial del gas, la distribución de sólidos, acumulación de gas y en el valor del K_{La} . La transferencia de masa desde la fase gaseosa depende en gran medida de las características de las burbujas presentes en el medio líquido. Por ejemplo, las burbujas pequeñas generan una mayor área interfacial, ascienden lentamente resultando en un mayor

tiempo de residencia y consecuentemente favorece la transferencia de oxígeno. Sin embargo, burbujas demasiado pequeñas (menores a 1 mm de diámetro) pueden no ser convenientes para ciertos procesos. Por ejemplo, para medios muy viscosos se prefiere burbujas de mayores diámetros (Doran, 1995). Estudios demostraron que al incrementar el número de orificios en el difusor y disminuir el diámetro mejora la transferencia de oxígeno al medio. La generación de burbujas pequeñas provoca una mayor acumulación de gas en la zona de ascenso como consecuencia de la disminución de la velocidad. La acumulación de gas en el tubo interno disminuye la fuerza motriz (diferencia de densidades) lo que resulta en una menor velocidad de circulación del líquido (Lu et al., 2011).

Por otro lado, una mayor cantidad de orificios en el difusor resulta en la disminución de la velocidad de salida del gas por cada orificio, lo que debilita el impacto de la fase gaseosa en la fase líquida y genera una burbuja de mayor tamaño, consecuentemente disminuye la acumulación global de gas en la zona de ascenso. Adicionalmente, al disminuir el tamaño de orificio se produce una mayor acumulación de gas en la zona de ascenso y una disminución de la velocidad del líquido (Merchuk et al., 1998). Al aumentar el tamaño del orificio, el tamaño medio de las burbujas y la velocidad de ascenso del líquido aumenta (el gas recircula menos), de manera que la diferencia entre las densidades de la zona de ascenso y descenso aumenta resultando en un mayor movimiento el cual disminuye el tiempo de circulación del líquido.

2.4.4. Geometría del cuerpo del biorreactor y de la zona de desgasificación

Los primeros estudios acerca de la geometría de los biorreactores cilíndrico-cónicos se realizaron por Nathan (1930). Posteriormente se realizaron una serie de recomendaciones las cuales son las siguientes (Shardlow, 1972):

- Usar un ángulo de cono en la zona de desgasificación y de evacuación igual o menor a 90°.
- La regulación de la temperatura debe realizarse rápidamente hacia el final de la atenuación celular.

La aplicación de biorreactores airlift de base cilíndrico-cónico en procesos de fermentación ayuda en la sedimentación de las levaduras. Unterstein (1994) recomendó que los biorreactores de base cónica deberían tener un ángulo de 60° y una altura total máxima entre 12 y 15 m.

La zona de desgasificación o de separación de gas-líquido tiene una gran influencia en el comportamiento hidrodinámico del biorreactor, es decir, la velocidad de recirculación de gas, tiempo de homogenización, velocidad del líquido, retención de gas en la zona de descenso y

K_{La} (Russel et al., 1994). Existen diferentes diseños de la zona de desgasificación (Figura 13), los cuales se basan en dos criterios; *i*: la distancia entre el límite superior del tubo interno y el límite superior de la zona de descenso que permita la salida del gas del líquido antes que se direcciona a la zona de descenso y, *ii*: el incremento del área transversal de la zona de descenso que resulta en la disminución de la velocidad del fluido comparado con la velocidad en el tubo interno. La reducción de la velocidad en la zona de descenso también se logra colocando baffles con la finalidad de incrementar la distancia de recorrido (Figura 13e, 13f).

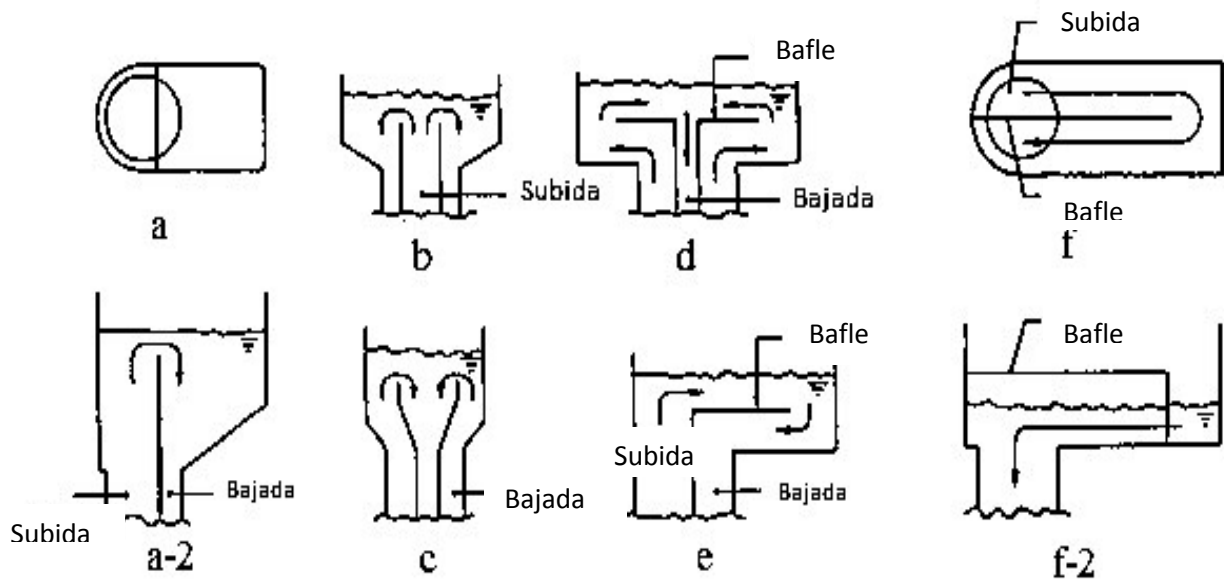


Figura 13. Diseños del separador de gas para biorreactores airlift

2.4.5. Relación entre el área transversal del tubo interno (A_r) y la zona de descenso (A_d) y relación entre la longitud del tubo interno (L_r) y la zona de descenso (L_d).

La relación entre el área transversal del tubo interno y la zona de descenso (A_r/A_d) así como la relación entre la longitud del tubo interno y la zona de descenso (L_r/L_d) influye en la performance del biorreactor. El incremento de los valores de A_r/A_d y L_r/L_d incrementa la velocidad del líquido en el biorreactor. En sistemas que trabajan con alta densidad celular se recomienda una relación de A_r/A_d entre 0.5 – 0.8 con la finalidad de obtener una distribución de sólidos uniforme (Klein et al., 2003). El volumen de gas acumulado en el tubo interno es proporcional a la acumulación en la zona de descenso, el cual varía entre 0.8 a 1 en biorreactores sin zona de desgasificación (Chisti et al., 1989). Tal relación depende del diámetro del tubo interno, ya que, si es menor ofrece resistencia al flujo de aire y disminuye la velocidad de circulación, repercutiendo en la acumulación de gas en la zona de descenso (Kilonzo et al., 2010).

Drandev et al., (2016) concluyó que un Ad/Ar de 2 conlleva a una mayor acumulación de gas y menor tiempo de mezcla. Además al incrementar la relación Ad/Ar el coeficiente volumétrico de oxígeno disminuye al ir disminuyendo la velocidad superficial del gas.

2.4.6. Flujo de gas

El flujo de gas influye en la velocidad de circulación y en la mezcla del medio de cultivo. Además del flujo de gas (oxígeno), el tipo de difusor y la porosidad determinan el tamaño de las burbujas y consecuentemente afecta la transferencia de oxígeno desde la burbuja hacia el líquido. Asimismo, el flujo de gas influye en el grado de dispersión y coalescencia de las burbujas (Doran, 1995). Por otro lado, una alta concentración de sólidos en el medio de cultivo disminuye la velocidad de circulación del líquido y el tiempo de homogenización del sistema (Klein et al., 2003). La disminución de la tensión superficial debido a la presencia de compuestos como el etanol, incrementa la retención de gas en la zona de descenso (Freitas et al., 1998). Por otro parte, la velocidad superficial del gas (U_{GR}) en el tubo interno tiene una relación directa con el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (Kawase et al., 1987). Así, a medida que aumenta la velocidad superficial de gas, aumenta la transferencia de oxígeno (Figura 14). Cerri et al., (2008) concluyó que el aumento de U_{GR} incrementa el coeficiente de transferencia de masa convectiva (k_L), el área interfacial (a) debido a la disminución del espesor de la película líquida (δ) y el aumento del atrapamiento de gas.

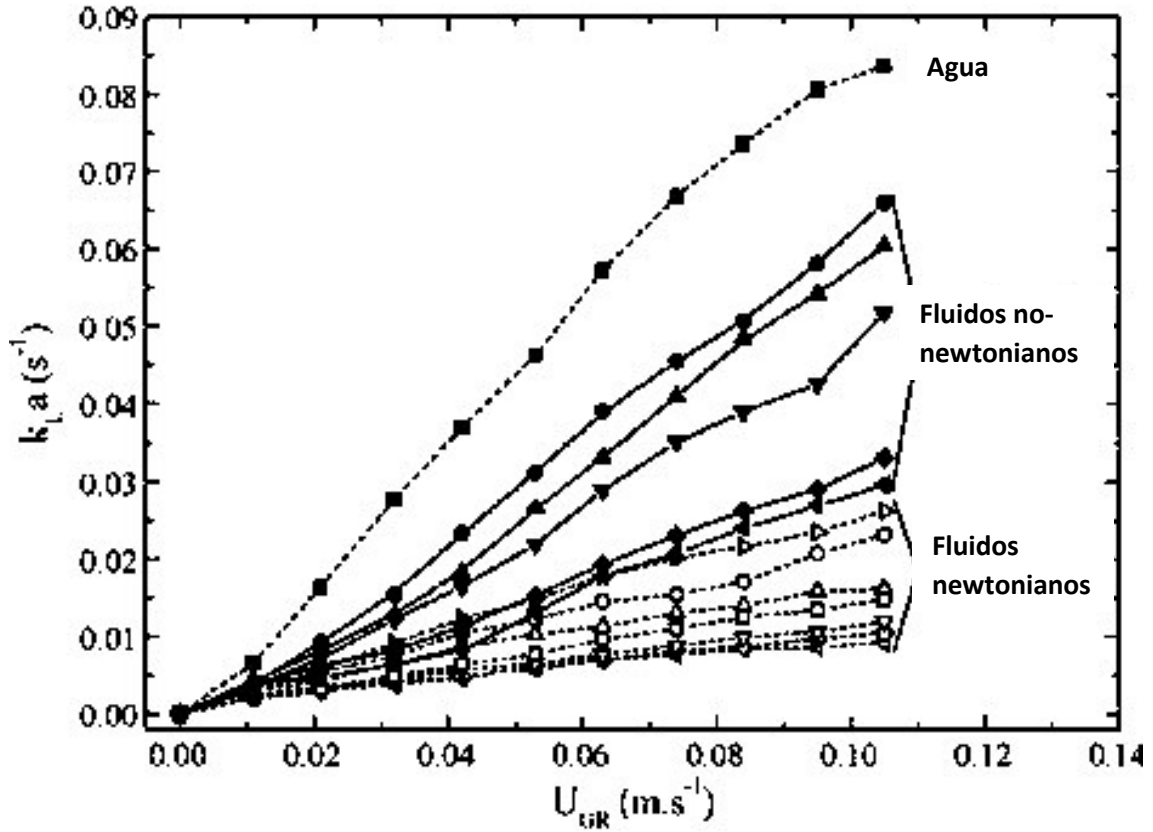


Figura 14. Relación entre K_{La} y la velocidad superficial de gas (U_{GR}) en el tubo interno, para diferentes tipos de fluidos (Kawase et al., 1987)

Con respecto al consumo de energía, la potencia necesaria para la circulación del líquido está determinado por la inyección de gas mediante dos aspectos: la expansión isotérmica del gas cuando se mueve hacia arriba (desde una presión hidrostática en la base hasta presión atmosférica en la zona de desgasificación) en el biorreactor y la energía cinética (Chisti, 1989). En los biorreactores airlift la entrada de energía específica puede denotarse como una función de la velocidad de gas:

$$\frac{P_G}{V_L} = (\rho_L) * g * \left(1 + \frac{A_D}{A_R}\right)^{-1} U_{GR} \quad (1)$$

Donde; P_G es la potencia mecánica para la inyección de gas, V_L es el volumen de fase líquida en el biorreactor, ρ_L es la densidad de la fase líquida, A_D/A_R es la relación de áreas transversales, U_{GR} es la velocidad superficial de gas en el tubo interno y “g” la aceleración gravitacional.

2.5. Fenómenos de transporte: transferencia de masa en la operación de biorreactores airlift

En la operación de biorreactores airlift se producen diferentes procesos de transferencia de masa que involucra la interacción de tres fases: líquido-sólido, líquido-líquido, gas-líquido. Estas tres fases están representadas por el líquido propiamente dicho que contiene disueltas las sustancias nutritivas, las burbujas de gas que puede ser aire y las células que representan la fase sólida quienes consumen los nutrientes y el oxígeno.

2.5.1. Transferencia de masa en un sistema líquido-sólido

La transferencia de masa entre un líquido en movimiento y un sólido (célula) tiene mucha importancia en los bioprocesos fermentativos. La célula presente en el medio interactúa con el sustrato diluido en el medio originando una gradiente de concentración entre la interface (límite entre la membrana celular y el líquido, C_{Ai}) y el seno del medio líquido (C_{Ao}), como se observa en (Figura 15). Es decir, a medida que la célula va incorporando a su metabolismo el sustrato del medio, C_{Ai} disminuye, por lo tanto, el nutriente debe ser transportada desde el seno del líquido (C_{Ao}) hacia el límite entre la membrana celular y el líquido movido por una gradiente de concentración con la finalidad de mantener en equilibrio el sistema (Doran, 1995).

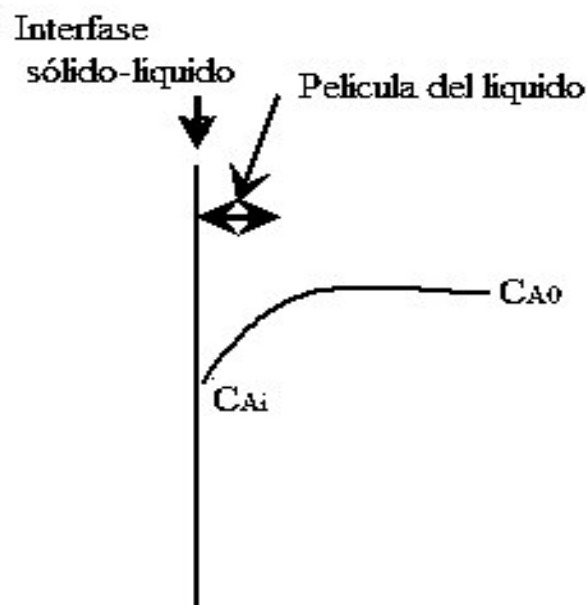


Figura 15. Gradiente de concentración para la transferencia de masa en un sistema líquido-sólido (Doran, 1995)

La velocidad volumétrica (N_A (g/L.h)) que gobierna la transferencia de masa en un sistema líquido-sólido es la siguiente:

$$N_A = k_L a (C_{A0} - C_{Ai}) \quad (2)$$

Donde; K_L es el coeficiente de transferencia de masa desde la fase líquida, 'a' es el área interfacial líquido-sólido por unidad de volumen, C_{Ai} es la concentración de sustrato entre la interface sólido líquido y seno del líquido y C_{A0} es la concentración de sustrato en el seno del líquido.

Generalmente el valor de K_L se puede hallar mediante modelos existentes en la bibliografía, los cuales se basan en el hecho que la concentración de un componente en la interface depende de la velocidad de consumo, es decir, la concentración en la interface se puede hallar únicamente conociendo la velocidad de reacción en la superficie del sólido (células). Si la transferencia de masa desde C_{A0} a C_{Ai} es más lenta que la reacción de consumo, puede que el sustrato se termine antes de alcanzar el centro del sólido (célula), entonces la concentración en el centro es cero, lo cual es perjudicial para las células que se encuentran en esta zona causando su muerte por inanición (Doran, 1995).

2.5.2. Transferencia de masa en un sistema líquido-líquido

La transferencia de masa en un sistema líquido-líquido se produce entre dos solventes inmiscibles. Este tipo de transferencia se da cuando se utiliza hidrocarburos como sustrato de fermentaciones, por ejemplo en la producción de biomasa microbiana. En la Figura 16 se muestra la interface entre dos líquidos inmiscibles.

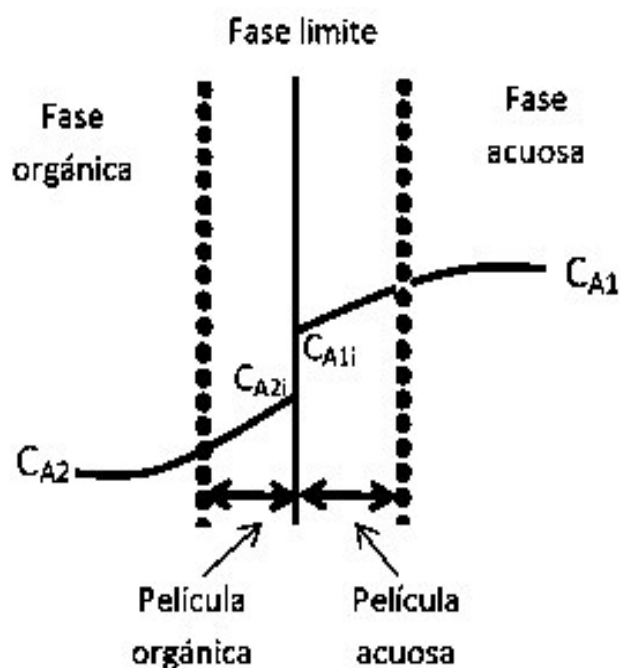


Figura 16. Interface entre dos sistemas inmiscibles (Doran, 1995)

La concentración del componente C_{A1} se reduce hasta C_{A1i} en la interface y del otro componente se reduce desde C_{A2i} hasta C_{A2} , entonces la velocidad de transferencia de masa (N_A (g/L.h)) entre dos líquidos inmiscibles se describe con las ecuaciones:

$$N_{A1} = k_{L1}a (C_{A1} - C_{A1i}) \quad (3)$$

$$N_{A2} = k_{L2}a (C_{A2i} - C_{A2}) \quad (4)$$

En muchos casos el área interfacial 'a' es difícil de conocer en procesos de transferencia de masa en sistemas líquido-líquido. Para mezclar dos fases es necesario someter a agitación, sin embargo, esta condición hace que el valor del K_L cambie, por ello para cuestiones de cálculo se expresa generalmente en términos de K_{La} . La velocidad de transferencia de masa entre dos fases no depende simplemente de la gradiente de concentración que existe, sino también de las condiciones de equilibrio en ambas fases (Doran, 1995).

2.5.3. Transferencia de masa en sistemas gas-líquido

La transferencia de masa en un sistema gas-líquido es importante en fermentaciones aerobias ya que el oxígeno es necesario para la actividad biológica de las células. El principio matemático que rige la transferencia de masa en un sistema gas-líquido es similar a los utilizados en sistemas líquido-sólido y líquido-líquido como se muestra a continuación:

$$N_A \left(\frac{g}{L} \cdot h \right) = k_L a (C_{AL}^* - C_{AL}) \quad (5)$$

Donde; N_A : Velocidad volumétrica de transferencia de masa, C_{AL}^* es la concentración de oxígeno en saturación, C_{AL} es la concentración de oxígeno en el medio. Esta diferencia de concentraciones es la fuerza impulsora para la transferencia de masa (Doran, 1995).

En fermentaciones aerobias, el oxígeno contenido en las burbujas de aire debe atravesar muchas resistencias para luego disolverse en el medio y poder ser utilizadas por las células. El proceso de transferencia depende de muchos factores entre ellos: la composición y propiedades reológicas del medio líquido (fluido newtoniano o no newtoniano), la geometría del biorreactor, la intensidad de mezclado, tamaño de burbuja, etc. El proceso de transferencia de oxígeno se muestra en la Figura 17. La mayor resistencia corresponde a la película líquida que rodea a las burbujas de gas, el transporte a través de esta película viene a ser una limitante en el proceso ya que controla la velocidad de transferencia de oxígeno desde las burbujas (Doran, 1995).

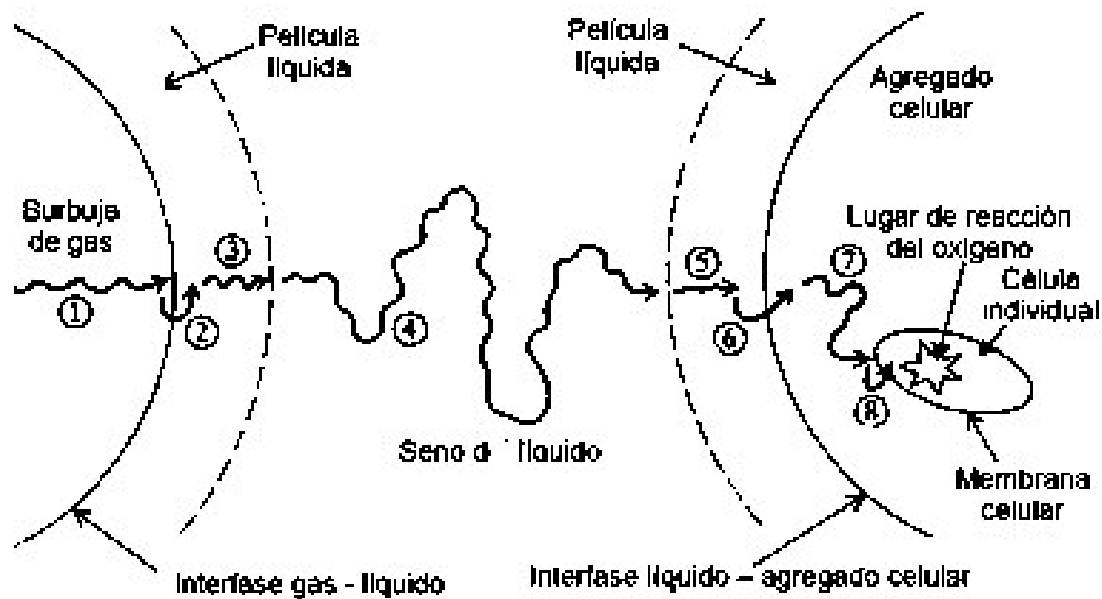


Figura 17. Proceso de transferencia de oxígeno desde las burbujas de gas hasta las células (Doran, 1995)

Las secuencias involucradas en la transferencia de oxígeno son:

1. Transferencia desde el seno o núcleo del gas a la interface gas-líquido.
2. Movimiento a través de la interface gas-líquido.
3. Difusión a través de la película inmóvil que rodea a la burbuja de gas.
4. Transporte del oxígeno a través del seno del líquido.
5. Movimiento a través de la segunda región estancada asociada con la célula.
6. Movimiento a través de la interface líquido-célula.
7. Si las células están en un soporte, agregado o partícula sólida, difusión a través del sólido hasta cada célula individual.
8. Transporte a través del citoplasma hasta el lugar de reacción en la célula.

La transferencia de oxígeno está determinada por el coeficiente volumétrico de transferencia de masa de oxígeno (K_{La}) que es un parámetro muy importante en el diseño de biorreactores. El K_{La} está influenciado por la geometría del biorreactor, las propiedades del medio de cultivo entre otros parámetros (Gouveia et al., 2003). Se han realizado algunos estudios sobre la influencia de parámetros de operación en el valor de K_{La} y se ha demostrado que el incremento de la velocidad superficial de gas (U_{GR}) en el tubo interno incrementa el valor del K_{La} sin importar el volumen del biorreactor (Juraščík et al., 2006). Además, la retención global de gas (ϵ_G) también influye en la variación del K_{La} a medida que el tamaño del biorreactor aumenta.

Por otro lado, también se ha demostrado que el K_{La} es el parámetro más adecuado para el escalamiento en biorreactores airlift de bucle interno (Cerri et al., 2010).

2.6. Fenómenos de transporte: transferencia de calor en la operación de biorreactores airlift

La evacuación del calor producido por las reacciones bioquímicas dentro del biorreactor por la actividad celular es importante ya que su acumulación puede conducir al incremento descontrolado de temperatura afectando la actividad biológica de los microorganismos. La producción de calor metabólico en la mayoría de fermentaciones industriales oscila entre 3-5 kW/m³. Los problemas más críticos de transferencia de calor suceden en fermentaciones con altas densidades celulares y en aquellas que usan hidrocarburos y metanol como fuente de carbono. Normalmente, el incremento de la temperatura se controla suministrando agua fría al sistema a través de chaquetas externas y serpentines colocados internamente. Con menos frecuencia, se usan deflectores especiales (de doble pared) o intercambiadores de calor. El sistema de evacuación de calor debe eliminar no sólo el calor metabólico producido durante la fermentación, sino también aquel generado por el gas utilizado en la agitación neumática en el caso de los biorreactores airlift. Se considera que toda la energía neumática de entrada se disipa como calor ya que dicha energía o carga destinada a la agitación/aireación no supera el 25 % de la carga total (Chisti, 1998).

En un biorreactor Airlift, la velocidad a la que se transfiere el calor está dada por:

$$Q = U * A * \Delta T \quad (6)$$

Donde Q es el calor que se transfiere en W, U es el en W/m²*K, A es el área en m², y ΔT es la diferencia de temperatura entre los medio y agua de refrigeración en K.

El coeficiente U representa la conductividad del sistema, que depende de la geometría del sistema, las propiedades del fluido, la velocidad del flujo, el material de la pared y el grosor. La resistencia general a la transferencia de calor es el recíproco del coeficiente global de transferencia de calor. Se define como la suma de las resistencias individuales a la transferencia de calor a medida que el calor pasa de uno fluido a otro, y se puede escribir como:

$$\frac{1}{U} = \frac{1}{h_o} + \frac{1}{h_i} + \frac{1}{h_{of}} + \frac{1}{h_{if}} + \frac{1}{h_w} \quad (7)$$

donde, h_o es el coeficiente de la película exterior, h_i es el coeficiente de la película interior, h_{of} es el coeficiente de película incrustante exterior, h_{if} es el coeficiente de la película incrustante interior, h_w es el coeficiente de transferencia de calor de la pared (que es k/x), k es la conductividad térmica de la pared y “ x ” es el espesor de la pared en m. Las unidades para todos los coeficientes de película son $W/m^2 \cdot K$. Esta ecuación es aplicable para todos los casos, excepto un tubo de pared gruesa donde se debe usar un factor de corrección.

El coeficiente global de transferencia de calor depende de la tasa de agitación en el recipiente y la velocidad de circulación del agua de enfriamiento en la chaqueta. El valor esperado del coeficiente global de transferencia de calor debe estar en el rango de $500-1500 W/m^2 \cdot K$. En caso de un factor condicionante, por ejemplo células de animales y plantas, que sean sensibles a la cizalladura, la turbulencia del lado del recipiente debe reducirse; en consecuencia, el coeficiente de transferencia de calor se reducirá. En tales casos, la transferencia de calor aumentará solo al proporcionar más área de transferencia de calor. El área de la superficie efectiva adicional puede obtenerse teniendo un recipiente con una gran relación altura: diámetro, porque el volumen de un recipiente es proporcional a la altura multiplicado por el área de la sección transversal.

Las pequeñas diferencias de temperatura, ΔT , en un biorreactor suelen estabilizarse fácilmente, a menos que se use agua como medio de refrigeración, lo que significa que el producto del coeficiente global de transferencia de calor y el área de transferencia de calor, 'UA', debe ser grande. Por lo tanto, el área de transferencia de calor puede maximizarse teniendo agua de refrigeración en los deflectores así como en la camisa del biorreactor.

El flujo de agua en la chaqueta de enfriamiento se calcula con la siguiente ecuación:

$$Q_{retirarse} = w_{agua} * C_{p_{agua}} * (T_1 - T_2) \quad (8)$$

Donde:

$Q_{retirarse}$ = En W/m^3 .

W_{agua} = flujo de agua (kg/h)

$C_{p_{agua}}$ = calor específico del agua ($Kj/Kg \cdot s$)

T_1, T_2 = temperatura inicial y final ($^{\circ}C$)

Además el espesor de la pared del biorreactor se calcula con la ecuación propuesta por Brownell (1959):

$$e = \frac{\rho*(12 D)*(H-1)}{144*(2*S*E)} + C \quad (9)$$

Donde:

ρ = densidad del mosto (Kg/m³)

D = diámetro en 'm'

H = altura del líquido (m)

S = esfuerzo permisible (15 700 lb/plg²)

E = eficiencia de la soldadura (85%)

2.7. Tiempo de homogenización o mezclado (θ_m).

Es el tiempo necesario para mantener una solución como una mezcla completa en donde la temperatura, composición química, pH y concentración de solutos solubles son iguales en cualquier punto de la solución. Se han realizado algunos estudios sobre el efecto de algunos parámetros de operación en el tiempo de homogenización en biorreactores airlift con bucle interno. Se ha demostrado por ejemplo que el tiempo de homogenización está influenciado por la velocidad superficial de gas (U_{GR}) en el tubo interno (Tekic et al., 2014). Así, el tiempo de homogenización disminuye al aumentar el flujo de gas. El aumento de la velocidad superficial de gas aumenta la velocidad del líquido lo que a su vez permite la recirculación de las burbujas más grandes en el tubo de descenso y consecuentemente mejora el mezclado. Estos resultados fueron contrastados por Freitas et al. (2001), quienes demostraron que el tiempo de mezclado disminuye al aumentar la velocidad de gas (U_{GR}) en el tubo interno.

Existen diferentes métodos para determinar el tiempo de homogenización en un sistema. Se ha reportado que su magnitud es dependiente de los métodos de medición usados y por consiguiente dan diferentes valores del tiempo de homogenización (Kawase y Moo-young, 1987). Una de las técnicas usadas en la determinación del tiempo de homogenización es el pulso de pH propuesto por Van't Riet y Tramper (1991). En esta técnica se usa como solución el NaOH y el tiempo de homogenización se considera como el tiempo necesario para alcanzar el valor de pH correspondiente al ± 5 % de la variación del valor final de pH de acuerdo al criterio

de homogeneidad (Figura 18).). Un factor que afecta su determinación es el lugar de inyección de las soluciones de análisis en el biorreactor.

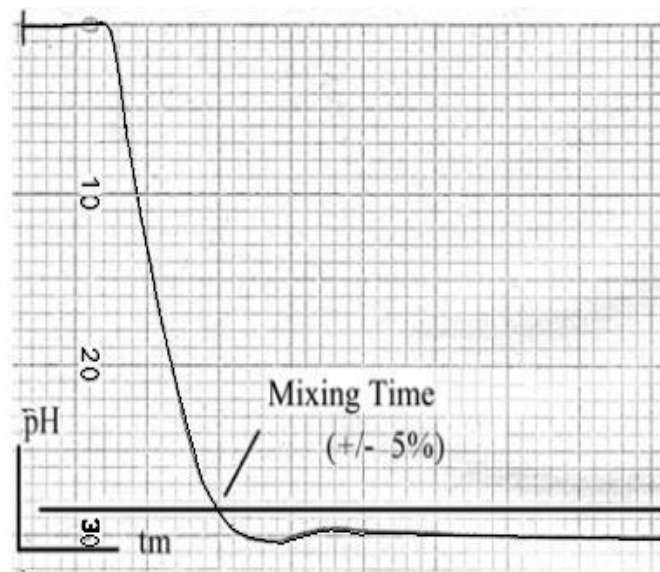


Figura 18. Curva típica para determinar el tiempo de homogenización por el método del pulso de pH (Van't Riet y Tramper, 1991)

Otros estudios mostraron que el tiempo de homogenización está influenciado por el tipo de difusor de gas. Por ejemplo, el instalar un difusor de placa perforada disminuye el tiempo de homogenización trabajando a diferentes magnitudes de flujo de gas (Brányik et al., 2005).

2.8. Retención de gas (Φ).

Representa la fracción volumétrica del gas contenida en el volumen total de una dispersión de gas-líquido-sólido. El diseño geométrico y la configuración del biorreactor tienen influencia significativa en la retención de gas. Por ejemplo, la variación de la relación Ar/Ad , la distancia entre el difusor y el límite inferior del tubo interno tienen influencia en la acumulación global de gas. Los valores de retención de gas varían tanto en la zona de ascenso y descenso y en la zona de degasificación. El valor promedio hace referencia a todo el volumen de trabajo del biorreactor. La ecuación usada para calcular el gas retenido (Φ) en un volumen de líquido es el siguiente:

$$\Phi_i = \left(\frac{V_G}{V_G + V_L + V_S} \right)_i \quad (10)$$

Donde; los subíndices G, L, y S indican gas, líquido y sólido e “i” indica la región de retención de gas considerado, es decir, separador de gas (s), zona de ascenso (r), zona de descenso (d), o volumen de trabajo total del biorreactor (T) y V es el volumen (L).

El valor de retención de gas da información sobre el potencial de transferencia de masa, ya que, para un sistema dado, un valor de retención de gas grande indica una mayor área interfacial gas-líquido. La diferencia entre la retención de gas de la zona de ascenso y descenso genera la fuerza motriz para la circulación del medio en sistemas gas-líquido. La retención total de gas se determina con mucha precisión midiendo el cambio de volumen (o altura) de la dispersión gas-líquido y comparándolo con el sistema sin inyección de gas. La medición de las retenciones de gas locales requiere métodos sofisticados como por ejemplo la medición de la presión a lo largo de la zona de análisis o la utilización de electrodos (Meng et al., 2002).

2.9. Efecto de la configuración del biorreactor airlift en el nivel del medio de cultivo

El nivel del medio de cultivo que se observa en el biorreactor es el resultado del volumen del medio de cultivo más el gas retenido en la zona de degasificación. Los parámetros que determinan si una burbuja de gas que asciende por el tubo interno sea liberada en la zona de degasificación o sea arrastrada hacia la zona de descenso son: *i*: la velocidad de la burbuja en el tubo interno el cual está en función del tamaño de burbuja y de la viscosidad del medio de cultivo, *ii*: la velocidad del líquido en la zona de descenso el cual está en función de la gradiente generada por la diferencia de volumen de gas retenido en la zona de ascenso y descenso y, *iii*: el tiempo de residencia de la burbuja en la zona de degasificación el cual está en función de la geometría del separador de gas y el nivel de líquido. Si la velocidad del líquido en la zona de descenso es menor que la velocidad de la burbuja en el tubo interno la burbuja no será arrastrada hacia la zona de descenso (Merchuk et al., 2009).

2.10. Aplicaciones de los biorreactores airlift en bioprocesos

Los biorreactores de agitación neumática tienen amplias aplicaciones en numerosos bioprocesos industriales. Los biorreactores airlift de bucle interno se utilizan por ejemplo en la producción de proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales a partir de cultivos celulares de mamíferos. También en la producción de drogas como penicilina G utilizando *Penicillium chrysogenum* (Wang et al., 2005). También se utilizan en la producción de exopolisacáridos microbianos a partir de bacterias y en la producción de otros polímeros

utilizando *Ganoderma applanatum*, *Grifola frondosa* y *Sclerotium glucanicum*. También se ha documentado la obtención de celulosa bacteriana de cultivos con *Acetobacter xylinum* (Kang et al., 2001). Estos biorreactores también han encontrado aplicación en procesos de tratamiento de aguas residuales debido a su bajo consumo de energía. Por ejemplo, han sido utilizados para el tratamiento de aguas residuales del procesamiento de almidón y agua domésticas (Jin et al., 2002). Otras aplicaciones incluyen en la eliminación de metales pesados de aguas residuales contaminadas utilizando microorganismos específicos. Finalmente, la aplicación de estos biorreactores en procesos fermentativos alcohólicos ha causado gran interés, particularmente en la producción de cerveza (Siegel y Robinson, 1992).

2.11. Principios generales de producción de cerveza

La industria cervecera es una de las más importantes a nivel mundial y en los últimos años se ha venido buscando alternativas que sean más eficientes y de mejorar productividades (Hough, 1991). La cerveza es una bebida alcohólica preparada a partir de granos de cebada malteados, lúpulo, agua y levaduras. El contenido de etanol puede variar desde unos pocos mililitros hasta 12 – 13 %v/v. La cerveza es una bebida que además de etanol contiene azúcares, proteínas, minerales y vitaminas los cuales son componentes nutricionales importantes. En la Tabla 2 se muestra la composición química de una cerveza comercial.

Tabla 2. Composición química de una cerveza comercial (Sanchis et al., 2000)

Compuestos	Concentración
Agua	918/1000g
Etanol	40.3g/kg – 551.5 mL/L
Carbohidratos	33.8 g/L
Dióxido de carbono	5.15 g/kg
Proteína total (Aminoácidos)	4.2 g/L (1.2g/L)
Glicerol, alcoholes, esterres, ácidos orgánicos, aldehídos y cetonas	2100 mg/L
Minerales	1300 mg/L
Derivados del lúpulo	400 mg/L
Vitaminas (vitamina B)	210 mg/L (42.5 mg/L)

Sustancias fenólicas	175 mg/L
Anhídrido sulfuroso	5 mg/L
Contenido calórico	420 kcal/kg

2.11.1. Insumos usados en la elaboración de cerveza

En el proceso de elaboración de cerveza se utilizan cuatro constituyentes básicos: la cebada o malta, agua, lúpulo y levadura. La utilización de cebada es necesaria ya que a ella se debe su nombre de esta bebida.

A. La Cebada

La cebada es el insumo principal para la producción de cerveza, las especies *H. vulgare* y *H. distichon* se usan industrialmente. La cebada cervecera debe cumplir con ciertos requisitos de calidad, como por ejemplo, el tamaño uniforme de los granos y no poseer sustancias extrañas, los granos deben ser enteros y poseer un alto poder de germinación; además aporta una gran cantidad de componentes para una correcta fermentación, especialmente aminoácidos libres (Hornsey, 2003). La cebada está compuesta por una alta cantidad de almidón y proteínas los cuales en el proceso de malteado y macerado se desagregan para generar azúcares simples y aminoácidos que sirven como nutrientes para la levadura (Hough, 1991). El almidón está compuesto de amilosa y amilopectina, también hay presencia de polisacáridos no amiláceos como azúcares (sacarosa y rafinosa), gomas y hemicelulosas (β glucanos y pentosanos), proteínas como albúmina, globulina, hordeínas y glutelina, lípidos como fosfolípidos, ácido palmítico, oleico y linolénico y, otros constituyentes como mono y polifenoles además de los iones como el K^{+1} , PO_4^{-3} , Mg^{+2} , Na^{+} , Cl^{-} (Hornsey, 2003).

Las maltas pueden distinguirse como bases y especiales los cuales se detallan a continuación:

a) Malta base

Existen tres tipos de maltas bases, Pilsen, Munich y Vienna que son las más comunes y utilizadas. La malta Pilsen es la que más se utiliza en todo el mundo para elaboración de cerveza, debido a que su color es muy claro y su sabor suave, dándonos como resultado cervezas rubias o doradas con sabores muy suaves. Las maltas Múnich y Vienna, nos dan como resultado

cervezas de tonos un poco más oscuros que pueden llegar al rojo claro y sabores más intensos a malta (Hough, 2002).

b) Malta especial

Son aquellas que proporcionan color, sabor y olor especiales a los diferentes tipos de cervezas que se producen. Tenemos la malta Caramelo de 30, 50 y 80 grados, que se utiliza para dar más color a la cerveza rubia, y también acentuar el sabor a malta; la malta negra o malta chocolate que se utiliza para elaborar la cerveza negra, una cerveza 100% oscura, espesa con un sabor fuerte, además de una espuma muy densa (Hough, 2002).

B. La Levadura

Es la responsable de la conversión de azúcares fermentables en etanol y CO₂. Hansen (2003), aisló y clasificó a las levaduras cerveceras en *Saccharomyces cerevisiae* (levadura ale) y *Saccharomyces carlsbergensis* (levadura lager). Bajo esa clasificación se estudió y se pudo identificar que la levadura “ale”, realiza una fermentación alta, no puede metabolizar melobiosa, la temperatura de fermentación óptima es de 18 a 22 °C y es más floculante que la levadura lager. Por otro lado, la levadura “lager” es de fermentación baja, puede metabolizar melobiosa y la temperatura óptima de fermentación es de 7 a 15 °C. Además, el reemplazo de inóculos de levadura es más frecuente en procesos de producción de cerveza “lager” que en procesos “ale”. La levadura “lager” suele ser reutilizada hasta en ocho ciclos batch, mientras que para las cervezas “ale” es más probable que se reutilicen hasta doce ciclos batch.

En general una buena cepa de levadura debe poseer una fermentación rápida, ser resistente al etanol y a la presión osmótica, tener estabilidad genética a lo largo del tiempo, mostrar altos rendimientos de etanol, así como perfiles de producción de sustancias aromáticas equilibrada y reproducible (Machin, 2016).

C. El agua

La naturaleza del agua y el pH es de suma importancia en la fabricación de cerveza. Se ha demostrado que el contenido de sales y especialmente su dureza influyen en el sabor, color y el olor de la cerveza. Por tal motivo, como norma general se recomienda utilizar aguas blandas con poco contenido en sales. Teniendo en cuenta la dureza del agua, es preciso mencionar que aguas con una cierta dureza son ideales para ciertos tipos de cerveza como por ejemplo cervezas “ale” ya que otorgan ciertos aromas agradables mientras que aquellas que poseen una muy baja dureza se utilizan en la elaboración de cervezas “lager” (Hough, 1991). La influencia del contenido de minerales del agua sobre el pH es importante durante la fabricación, ya que algunos minerales como los iones calcio ejercen una función estabilizadora sobre las amilasas. Los iones de calcio reaccionan con los fosfatos orgánicos e inorgánicos de la malta precipitando fosfatos de calcio, el resultado es la acidificación del mosto si el calcio se halla en forma de sulfato (Gorostiaga, 2008).

Para obtener un rendimiento óptimo del proceso y para mantener la máxima calidad del producto, la elaboración de cerveza de diferentes estilos de cerveza requiere agua con espectros iónicos particulares. Este hecho ha sido reconocido durante mucho tiempo por observación empírica, aunque la ciencia subyacente no fue entendida. Por lo tanto, la disponibilidad de suministros locales adecuados de agua representa el ascenso a la prominencia de los centros más famosos de excelencia cervecera. Por ejemplo, la reputación de pueblos y ciudades como Pilsen, Dublín, Burton-upon-Trent, Dortmund y Munich se basan en gran medida en las cualidades del agua local. Pilsen tiene agua muy blanda con menos de 10 ppm de calcio, magnesio y sulfato y 10-20 ppm de bicarbonato. El agua del pozo Burton-upon-Trent es alta en dureza permanente. Contiene 250-300 ppm de calcio y bicarbonato, más de 600 ppm de sulfato y 60-70 ppm de magnesio. El agua de Munich es intermedia con 70-80 ppm de calcio, 10-20 ppm de sulfato y magnesio junto con 150 ppm de bicarbonato.

De ello se deduce que es ventajoso si el suministro local de agua es blando, ya que los requisitos de desionización son pequeños. Esto es especialmente cierto ya que, en cualquier caso, la mayor parte del agua se utiliza para fines de no elaboración de cerveza y tiene que ablandarse en la mayoría de las aplicaciones para evitar la corrosión de la planta.

Los iones en el agua de elaboración tienen roles vitales en las diversas etapas involucradas en la formación del mosto; contribuyen a la nutrición de la levadura, influyen en las propiedades tecnológicas de la levadura y tienen un impacto en el sabor de la cerveza. (Boulton, 2008)

D. El Lúpulo

El lúpulo proporciona el amargor a la cerveza, estabilidad biológica y de la espuma, e influye en gran medida en su sabor y aroma. Se comercializa lúpulo para dar sabor amargo y lúpulo para dar aroma, aunque también se comercializan lúpulos con doble finalidad. El lúpulo para dar amargor se añade al mosto al inicio de la ebullición y el lúpulo para dar aroma se agrega en cualquier momento después de los 30 minutos de haber agregado el lúpulo para dar sabor amargo (Roberts y Wilson, 2006).

Los α -ácidos, son mayormente responsables del amargor en la cerveza y representan alrededor del 3-4% del peso en las variedades de lúpulo para aroma. En variedades que se usan para dar amargor, los α -ácidos representan más del 20% del peso del cono. Los α -ácidos se dividen en tres análogos; humulona y adhumulona, los cuales son deseables, y la cohómulona que es indeseable. Elevados niveles de cohómulona tiende a reducir la estabilidad de la espuma de la cerveza, da un amargor desagradable y perfiles de olor pobre (Singer et al., 1954).

Los aceites esenciales del lúpulo son responsables del aroma e incluyen la humulona, que tiene un aroma amaderado y balsámico; El cariofileno, que tiene un aroma picante parecido a la pimienta negra; el mirceno, que tiene un aroma floral como el geranio; y el farneseno, que tiene un aroma floral como la gardenia. En general, aproximadamente 300 compuestos son probablemente contribuyentes de los perfiles de aroma del lúpulo (Roberts y Wilson, 2006).



Figura 19. Lúpulo en forma de pellets, plugs y flores secas

2.11.2. Proceso de elaboración de cerveza

Existen diferentes métodos de elaboración de cerveza en base a las características especiales deseadas, sin embargo, todas ellas utilizan los principios fundamentales de producción. Desde el punto de vista tecnológico existen dos tipos de cerveza de acuerdo a la temperatura de fermentación y al tipo de levadura utilizada en su producción. Las cervezas producidas por fermentación alta (15–24°C) se denominan cervezas “ale” y aquellas producidas por fermentación baja (7–15°C) son denominadas cervezas “lager”. La diferencia entre ellas aparte del método de elaboración usado son básicamente sus características sensoriales. Las etapas generales de producción de cerveza incluyen el malteado de la cebada, maceración, producción del mosto, fermentación y acondicionamiento (Hornsey et al., 2003). En la figura 20 se muestra el flujograma de elaboración de cerveza.

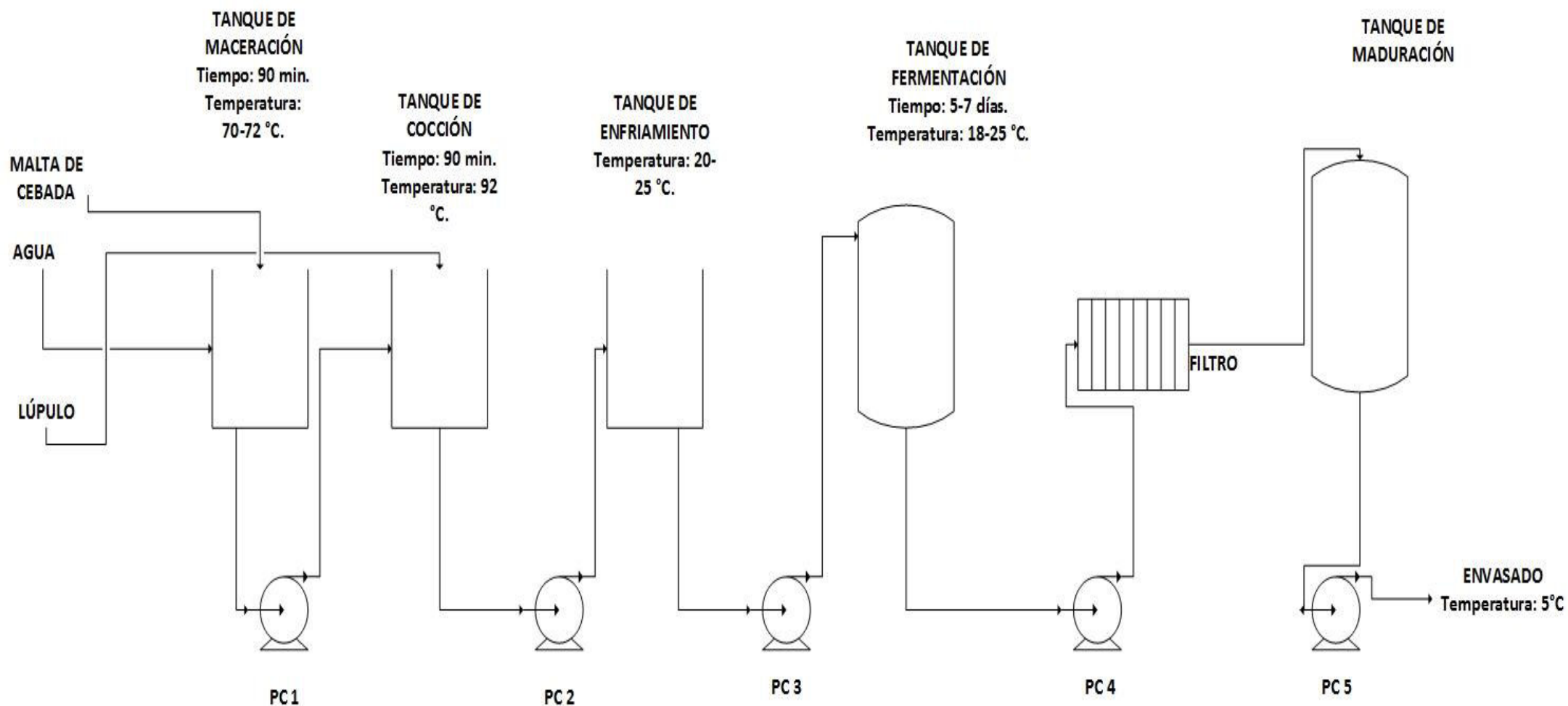


Figura 20. Diagrama de flujo de proceso de la elaboración de cerveza (Carvajal y Insuasti, 2011)

A. Malteado de la cebada

El proceso consiste en germinar los granos de cebada seleccionados a condiciones definidas y controladas de humedad, temperatura y flujo de aire. El proceso de germinación consiste en una serie de reacciones bioquímicas que suceden en el grado relacionados al proceso de respiración que resultan en la producción de enzimas hidrolíticas necesarias para etapas posteriores. La producción y activación de las enzimas se produce por la acción de ciertas fitohormonas llamadas giberelinas. Según Cogue et al. (2006), el malteado se divide en tres etapas:

- a) Remojo: La cebada se remoja en agua a 10–15°C para aumentar su humedad hasta el 35–48%.
- b) Germinación: El grano de cebada con una humedad entre 35 a 48 %, es transferido al equipo de germinación, en el que germinarán bajo las condiciones óptimas de temperatura, humedad y aireación. La duración es entre 3 a 5 días hasta que el tamaño del brote sea la tercera parte del grano.
- c) Secado y tostado: La germinación de los granos de cebada se detiene mediante el secado, el cual reduce la humedad de los granos hasta el 2–5%. Luego se realiza el tostado, el cual modifica el aroma y el color de la malta mediante reacciones de Maillard.

B. Macerado

Se realiza a condiciones definidas y controladas con la finalidad de extraer el almidón, proteínas, péptidos, lípidos y otros componentes de la malta y hacer fermentable el extracto, asegurando la hidrólisis enzimática en componentes metabolizables por la levadura.

El macerado se realiza mezclando la malta de cebada triturada con agua caliente en proporciones establecidas y dejando reposar a temperaturas controladas por tiempos definidos de acuerdo a la actividad optima de las enzimas hidrolíticas tales como proteinasas, peptidasas, fosfatasas, amilasas, etc. El objetivo es convertir el almidón en azúcares fermentables y las proteínas y péptidos en aminoácidos libres disponibles para la levadura. La solución que se

obtiene es llamada mosto y es rica en azúcares fermentables principalmente maltosa, destinando como alimento balanceado para animales.

La maceración sigue el siguiente perfil de temperatura según Stewart (2013):

- a. Primero: La temperatura inicial de 52°C se emplea para activar tanto la proteasa y glucanasa por un lapso de 15 a 20 min.
- b. Segundo: Después de 15-20 min, la temperatura se incrementa gradualmente hasta 65°C. Esta temperatura es la temperatura de sacarificación, es óptima para la actividad de la α y β amilasa. La α -amilasa es una endoamilasa que hidroliza enlaces 1,4- α -glucosídicos en amilosa y amilopectina. La β -amilasa es una exoenzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces 1- α y 4- α a los extremos de la cadena no reductora, liberando la maltosa y la maltotriosa y los oligosacáridos (también llamados dextrinas).
- c. Tercero: Después de aproximadamente 30 minutos a 65°C, la temperatura se eleva a 78°C. La finalidad es inactivar las enzimas pero además, se producirá una α -amilolisis, mientras que a esta temperatura la β -amilasa se inactivará rápidamente.

C. Obtención del mosto

Tiene la finalidad de detener la actividad enzimática y la hidrólisis de polímeros. Aquí se añade el lúpulo en cantidades que dependen de la formulación de la cerveza (Hornsey et al., 2003). El tiempo de cocción determina el grado de extracción de ácidos del lúpulo que determinan el amargor de la cerveza. Luego de la cocción y separación de sólidos coagulados, el mosto obtenido se enfría hasta la temperatura de fermentación.

D. Fermentación del mosto

Es la etapa más importante de la producción de cerveza en donde los azúcares del mosto son convertidos en etanol, CO₂ y compuestos aromáticos. Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* son las responsables de la calidad sensorial de la cerveza debido a que producen los compuestos químicos responsables del aroma. El proceso de fermentación consiste en dos fases, la fermentación primaria y secundaria. La fermentación secundaria también es conocida como maduración y se realiza con la finalidad de completar la calidad de la cerveza. La duración de la fermentación primaria depende del tipo de cerveza (ale o lager) a producir. En el caso de la

producción de cerveza “ale” la fermentación primaria puede durar entre 6 y 7 días ya que se realiza a temperaturas que va desde 15 a 24°C y en el caso de la cerveza lager mucho más ya que se realiza a menores temperaturas (7-15°C). La fermentación secundaria puede durar 7 días e incluso mucho más y se realiza con el propósito de reducir el sabor indeseable originado por algunos componentes de la cerveza (Branyik et al., 2005). Para conseguir una fermentación exitosa el cual consiste en el consumo total de azúcares fermentables y aminoácidos libres necesario por la levadura y la producción adecuada de etanol es necesario diseñar un proceso de fermentación adecuado que incluya la preparación de un mosto de buena calidad, controlar los parámetros de fermentación, utilizar la levadura adecuada y elegir el sistema de fermentación (biorreactor) apropiado.

E. Acondicionamiento de la cerveza

La cerveza después de la segunda fermentación, contiene partículas en suspensión, por tal razón sigue turbia, la carbonatación y el sabor no es el adecuado, es inestable desde el punto de vista microbiológico y físico (Bamforth, 2003). En ese sentido es necesario que se realicen procesos posteriores tales como:

- a) Maduración: la levadura consume los azúcares fermentables presentes en la cerveza verde (fermentación secundaria). Se realiza a 0–2°C y dura una semana aproximadamente.
- b) Filtración y clarificación: la finalidad es eliminar los microorganismos y partículas coloidales en suspensión presentes en la cerveza al final, asegurándose una claridad estable en el producto final. Para ello la cerveza es bombeada hacia los filtros que pueden ser lauter o filtros prensa, estos equipos retienen las partículas en suspensión que le dan turbidez. Ambos filtros tienen características de funcionamiento que los hacen apropiados para procesos de fabricación de cerveza específicos en distintas plantas.
- c) Envasado y carbonatación: la cerveza a envasarse debe ser transparente, estar fría (–1 ó –2 °C) y presentar una correcta carbonatación, obtenida en la fermentación secundaria y/o mediante la inyección de dióxido de carbono. La carbonatación de la cerveza de expresa en volúmenes de CO₂ (litros de CO₂ disuelto en 1 Litro de solución), por ejemplo, la cerveza de trigo alemana debe tener entre 3.3 a 4.5 volúmenes de CO₂, la Porter entre 1.7 a 2.3 volúmenes de CO₂, las “ales” y “lager” americanas entre 2.2 a 2.7 volúmenes de CO₂.

Asimismo, en todo el proceso de envasado hay que minimizar al máximo el contacto con el oxígeno (Sanchís et al., 2000; Bamforth et al., 2003).

2.11.3. Biorreactores usados en la fermentación de cerveza y parámetros de control

Los biorreactores utilizados en la fermentación de cerveza se dividen en dos según el tipo de agitación: biorreactores con agitación mecánica (tanque agitado) y biorreactores de agitación neumática (columna).

a) Biorreactor de columna

Son de forma cilíndrica con un eyector de gas en el fondo y con distribuidores de gas en la base para asegurar una mezcla homogénea. En otros casos consta de dos tubos concéntricos (airlift) en donde el aire es inyectado desde el fondo y provoca movimiento por diferencia de densidades. El gas es expulsado en forma de burbujas en la fase líquida. Además, la parte superior de la columna suele ser de mayor diámetro para evitar arrastres. Este tipo de biorreactor no dispone de un sistema de transmisión mecánica para mezclar el medio donde se desarrolla la reacción (Menzolla, 2015). Los parámetros de control de este tipo de biorreactores usados en procesos de fermentación alcohólica son:

- El flujo de gas que ingresa al sistema.
- Temperatura
- pH
- Densidad celular
- Cantidad de CO₂
- Densidad del medio
- Grado alcohólico

Con el objetivo de disminuir el número de biorreactores e incrementar el volumen de producción se ha ido introduciendo procesos de fermentación de alta gravedad. Este tipo de procesos consiste en fermentar mostos con altas concentración de azúcares comparado a los procesos convencionales que usan mostos de 14 °Plato (Linko et al., 1998). Los procesos de alta gravedad utilizada en la cervecería tiene ventajas comprobadas tales como: producir un mayor volumen de cerveza sin ampliar las instalaciones existentes (Cunningham y Stewart, 1998), reducción de los costes operativos, mejor estabilidad de la cerveza, sabor más suave y mayor flexibilidad (Russell y Stewart, 1995). Sin embargo, surgen algunos inconvenientes

como por ejemplo, la alta presión osmótica y los altos niveles de etanol producidos generan un mal desempeño de la levadura en la fermentación (Pratt-Marshall et al., 2002). La eficiencia del proceso fermentativo se puede mejorar con el control de la temperatura, nivel de oxígeno y el suministro de nitrógeno asimilable, ácidos grasos insaturados y esteroides; siendo el nitrógeno asimilable un punto crítico. El nitrógeno asimilable permite un mayor crecimiento celular, aumento de biomasa e incremento de la tasa fermentativa (Ingledew y Kunkee, 1985).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño del biorreactor airlift

En el diseño del biorreactor se ha considerado criterios técnicos y operacionales necesarios para el correcto funcionamiento y performance durante procesos fermentativos. Los criterios técnicos considerados son los siguientes: volumen total, volumen de trabajo, zona de degasificación, tubo interno, geometría del difusor de aire y tubo de suministro, sistema de refrigeración, relación entre A_i/A_d (área de la sección transversal del tubo interno/área de la sección transversal de la sección anular que rodea al tubo interno), puertos de acoplamiento para dispositivos de medición y control, puertos de entrada y toma de muestra y, sistema de drenaje o descarga del medio fermentado (Chisti, 1989; Merchuk et al., 1994; Doran, 1995; Klein et al., 2003). Referente a los criterios operacionales se han considerado los siguientes: tiempo de homogenización y coeficiente volumétrico de transferencia de masa de oxígeno (Gouveia et al., 2003; Juraščík et al., 2006). El diseño del biorreactor y sus partes se muestran en el Anexo 1 al anexo 6.

3.2. Construcción y ensamblado del biorreactor

Para la construcción del biorreactor se tomó en consideración el tipo y la calidad del material, así como también el acabado sanitario que debe tener internamente. Se utilizó acero inoxidable AISI 304, el cual es usado para la construcción de equipos alimentarios, presenta un acabado superficial liso, es resistente al impacto y al ataque de ácidos y bases. Generalmente los procesos fermentativos trabajan en el rango de pH 3-6.5. El acero AISI 304 contiene alrededor de 0.08 % de carbono lo cual le otorga el carácter inoxidable (Huntz et al., 2007). La unión de las partes del biorreactor se realizó por soldadura TIG (Tungsten Inert Gas, por sus siglas en inglés) el cual permite conseguir un acabado sanitario. El acabado liso y sanitario permite trabajar asépticamente disminuyendo los riesgos de contaminación. Luego de la construcción se procedió a ensamblar las partes que incluyeron: la tapa, cuerpo, tubo interno, difusor de aire. La unión entre la tapa y el cuerpo del biorreactor se realizó a través de pernos de acero AISI 304 y una empaquetadura de nitrilo de grado sanitario y esterilizable. Con respecto al difusor, se utilizó uno de material poroso de las siguientes dimensiones: 2 cm diámetro y 3 cm de alto (Ver anexo 7).

3.3. Evaluación del comportamiento hidrodinámico del biorreactor airlift

Se evaluó el comportamiento hidrodinámico del biorreactor Airlift bajo ciertos parámetros de operación. Para ello, se usaron dos fluidos: agua bidestilada y una solución de glucosa de 14° Brix (el cual simula la concentración de sólidos solubles del mosto de malta de 14° Plato). Se usó agua bidestilada con la finalidad de asegurar la ausencia de cualquier componente que interfiere en las determinaciones. Se evaluaron tres variables de entrada: flujo de aire, A_r/A_d y distancia entre el tubo de ascenso y el difusor de aire y se observó el efecto en el tiempo de homogenización (Θ_m) y el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La}). Se desarrolló un diseño factorial 2^3 para cada tipo de fluido. Los valores mínimos y máximos de cada variable se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores mínimos y máximos de las variables de entrada consideradas en el diseño experimental (Russell et al., 1994; Choi et al., 1995; Juraščík et al., 2006; Luo et al., 2011)

Variables	Valor mínimo	Valor máximo
Relación de áreas (A_r/A_d)	0.4	0.8
Distancia entre el difusor y Riser (cm)	2	4
Flujo de aire (vvm)	0.24	0.42

3.3.1. Medición del tiempo de homogenización (Θ_m).

El biorreactor airlift se llenó con 2.7 L de medio líquido (27 % de volumen de trabajo), se ajustaron los parámetros de operación de acuerdo a la matriz de experimental. Se utilizó una sonda de pH y una solución de NaOH 2 N. La sonda de pH se ubicó a dos centímetros del nivel del fluido. Con una pipeta se adicionó 2 ml de NaOH 2N a la solución (agua ó solución de jarabe de glucosa) a 180° sobre el plano horizontal desde la sonda de pH en la zona de descenso, a una distancia de dos centímetros del nivel del líquido y dos centímetros del cuerpo. En el instante en que se adicionó el NaOH se tomó el tiempo y se anotaron los datos de variación de pH. El tiempo de homogenización es el valor en donde la oscilación de pH es igual o menor a 0.02 (Cascaval et al., 2007).

3.3.2. Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La}).

La determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La}) se realizó mediante el método “gassing-out”. Para ello, en el biorreactor conteniendo el fluido (agua bidestilada ó jarabe de glucosa 14°Brix) se instaló la sonda de oxígeno disuelto en la zona de descenso, con el bulbo a 10 cm del nivel del líquido y a 1.5 cm del cuerpo. Luego se hizo fluir nitrógeno al medio hasta que la concentración de oxígeno medido por la sonda sea menor a 0.06 mg/L. Posteriormente se inyectó aire en forma de burbujas a través del difusor al flujo correspondiente de ensayo (Tabla 3). Las mediciones de la concentración de oxígeno disuelto se registraron cada 30 segundos durante 15 minutos. Una vez que se obtuvieron los datos de concentración de oxígeno, se utilizó la siguiente ecuación (Kilonzo et al., 2007):

$$\ln \left(\frac{C^* - C_{i+1}}{C^* - C_o} \right) = -K_L a (t_{i+1} - t_i) \quad (11)$$

Donde:

C^* = Concentración de oxígeno en saturación a una temperatura específica.

C_o = Concentración inicial de oxígeno en el medio medido por el sensor de oxígeno disuelto (OD).

C_{i+1} = Concentración final de oxígeno en el medio medido por el sensor de oxígeno disuelto.

K_{La} = coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.

t_i = tiempo inicial de medición de oxígeno disuelto.

$t_{(i+1)}$ = tiempo final de medición de oxígeno disuelto.

3.4. Validación del biorreactor airlift en procesos de fermentación alcohólica

La validación del diseño, construcción y ensamblaje del biorreactor airlift se realizó in vitro en un modelo de proceso de fermentación de cerveza. Conocer el comportamiento hidrodinámico es importante para su operatividad y obtener los resultados esperados.

3.4.1. Mantenimiento de la levadura

Se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* s-33, empleada comercialmente en la producción de cerveza “ale”. La levadura liofilizada se reactivó en agua peptonada (10 g/L)

estéril por 30 minutos a 30 °C. Luego la cepa se sembró en tubos de ensayo conteniendo agar inclinado de la siguiente composición: extracto de malta 40 g/L, agar 18 g/L, peptona bacteriológica 2 g/L. El medio se esterilizó a 121 °C, 15 PSI por 20 minutos. Los tubos se incubaron a 20 °C por 72 horas hasta observar la aparición de colonias. Luego, los tubos se mantuvieron en refrigeración a 7 °C.

3.4.2. Propagación de células

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* s-33 se propagó a 25°C en matraces Erlenmeyer conteniendo 100 ml de mosto de malta diluido de 6 °Plato pasteurizado (115°C por 6 min). El medio de propagación se preparó a partir de extracto de malta concentrado de 80 °Brix adquirido de la empresa Aromas del Perú. Los matraces se agitaron a 200 rpm en un agitador orbital durante 24 horas. Luego de la propagación, las células se separaron por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos antes de utilizarlo como inóculo.

3.4.3. Ensayos de fermentación de mosto de malta

Se realizaron ensayos de fermentación en matraces Erlenmeyer con la finalidad de evaluar el comportamiento fermentativo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* s-33 a condiciones estáticas. Luego se realizaron ensayos de fermentación en el biorreactor “airlift” y los resultados de cinética obtenidos se compararon con aquellos observados en matraces Erlenmeyer realizados.

3.4.3.1. Fermentación de mosto de malta en matraces

Las fermentaciones se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 350 ml de mosto de malta de 14 °Plato pasteurizado (115 °C por 1 minuto), concentración utilizada en la producción de cerveza. Los matraces se inocularon con una cantidad de células rutinariamente utilizadas en la fermentación de cerveza (1×10^6 células/mL.°P). Las fermentaciones se realizaron a condiciones estáticas a 12 °C y 18 °C. Durante la fermentación se tomaron muestras cada 24 horas y se evaluaron la cinética de producción de etanol, consumo de aminoácidos y azúcares reductores.

3.4.3.2. Fermentación de mosto de malta en biorreactor airlift

Se realizaron fermentaciones de mosto en el biorreactor “airlift” de 10 L con un volumen de trabajo de 2.7 L. El ensamblaje del sistema de fermentación se muestra en la Figura 21. En los experimentos se utilizaron mosto de malta de 14 y 20 °Plato, flujo de aire de 0.13 vvm. El pH inicial del mosto fue de 5.2 y la concentración de células correspondiente a 1×10^6 células/ml. °P. Durante la fermentación se tomaron muestras cada 24 horas y se evaluaron la producción de etanol, consumo de azúcares reductores y crecimiento celular.

3.5. Análisis químicos de las muestras de mosto fermentado

3.5.1. Determinación de azúcares reductores

La determinación de azúcares reductores se realizó mediante el método de oxidación con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), el cual es un método colorimétrico desarrollado por Miller (1959). Para la cuantificación se construye una curva patrón en base a la oxidación de glucosa (estándar) a concentraciones definidas. La intensidad del color se mide mediante la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro. Para determinar la concentración de azúcares reductores en las muestras colectadas durante la fermentación; primero debe separarse las células por centrifugación (4000 rpm x 10 minutos) y luego hacer diluciones múltiples con agua destilada ya que el método es aplicable a bajas concentraciones de azúcares reductores.

3.6. Determinación de nitrógeno amino libre

La determinación de aminoácidos se realizó mediante el método de la ninidrina, el cual se fundamenta en la descarboxilación oxidativa de los aminoácidos resultando en la producción de CO₂, NH₃ y un aldehído. Como producto de la reacción se genera una coloración azul violeta el cual se analiza por espectrofotometría a 570 nm. Es un método colorimétrico desarrollado por Lie (1973). Para la cuantificación de aminoácidos se construye una curva patrón en base a la oxidación de glicina (estándar) a concentraciones definidas. Para determinar la concentración de aminoácidos en las muestras obtenidas durante los ensayos de fermentación primero se separan las células por centrifugación (4000 rpm x 10 minutos) y luego se hacen diluciones

múltiples con agua destilada previa al análisis ya que el método es aplicable a bajas concentraciones de aminoácidos.

3.7. Determinación de etanol

La determinación de etanol se realizó mediante oxidación con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) el cual es un método químico-colorimétrico modificado basado en el método propuesto por Borkenstein (1962). El método se fundamenta en la pérdida de uno o más hidrógenos del carbono que contiene el grupo $-OH$. El tipo de producto que se genera depende del número de estos hidrógenos que tiene el alcohol. La oxidación de alcoholes primarios como el etanol produce el correspondiente aldehído el cual se oxida a ácido. Para la cuantificación se construye una curva patrón en base a la oxidación de etanol (estándar) a concentraciones definidas. La intensidad del color se mide mediante la absorbancia a 440 nm en un espectrofotómetro. Para determinar la concentración de etanol en las muestras obtenidas durante la fermentación primero debe separarse las células por centrifugación (4000 rpm x 10 minutos) y luego destilarse por arrastre de vapor. El destilado recolectado se reconstituye con agua destilada hasta el volumen inicial de la muestra, luego se diluye sucesivas veces antes de la cuantificación.

3.8. Evaluación de la viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó mediante tinción con azul de metileno y observación en un microscopio óptico de acuerdo con lo establecido por la ASBC (1992). El método se fundamenta en que células con membranas celulares comprometidas son permeables al paso de azul de metileno tiñéndose de azul mientras que las células viables permanecen incoloras. Para el conteo de células se utiliza una cámara de Neubauer. Las muestras obtenidas durante la fermentación se diluyen sucesivas veces con agua destilada estéril y finalmente con una solución de azul de metileno. Se toma una alícuota de esta solución y se coloca en la cámara de Neubauer, el cual se coloca en un microscopio óptico para el conteo. El conteo se hizo por muestreo (4 cuadros), sacando un promedio posteriormente. La concentración celular se expresa como células/mL.

3.9. Evaluación sensorial de las cervezas producidas

Las cervezas obtenidas en los experimentos de fermentación con el biorreactor airlift se evaluaron sensorialmente mediante pruebas afectivas. Se seleccionó tres atributos comúnmente evaluados en cervezas (olor, sabor y color) y se utilizó una escala hedónica de 5 puntos (0=me desagrada mucho, 5=me agrada mucho). Para la evaluación sensorial se utilizó un panel compuesto de 22 jueces no entrenados, catorce varones y ocho mujeres de edades entre 22 y 25 años no consumidoras habituales de cerveza. Los resultados se compararon con cervezas artesanales adquiridos de un proveedor local.

3.10. Diseño de experimentos y análisis estadístico

Para evaluar el efecto de las variables de entrada (A_f/A_d , espaciamiento entre el difusor de aire y el tubo de ascenso y el flujo de aire) sobre el tiempo de homogenización (Θ_m) y el coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{La}) se utilizó un diseño factorial 2^3 . El diseño de experimentos se desarrolló con el software *Design Expert v7*®. Se consideró dos repeticiones por cada tratamiento y los resultados se presentaron en gráficos de superficie de respuesta. Asimismo, se obtuvo modelos matemáticos para cada caso considerando el mejor ajuste de los resultados (R^2). En la evaluación sensorial se realizó una prueba hedónica, los datos obtenidos se analizaron mediante el análisis de varianza y Prueba de Tukey, para determinar la significancia entre la cerveza artesanal y la cerveza producida en el birreactor airlift, el software utilizado para el análisis fue Infostat.'

IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Diseño y ensamblaje del biorreactor “airlift”

El diseño del biorreactor airlift se muestra en los anexos 1, 2, 3, 4, 5 y 6. El volumen total es 10L y el volumen de trabajo de 27.3% del volumen total. La zona de degasificación se amplió con la finalidad de incrementar el espacio para el alojamiento de la espuma e incrementar la eliminación del CO₂, lo cual podría ser inconveniente en el proceso fermentativo. El cuerpo del biorreactor y la zona de degasificación forman un ángulo de 45° con el plano horizontal cuyo propósito es facilitar el drenado del líquido. La parte inferior tiene una geometría cónica para facilitar el rápido drenado del medio fermentado y también facilitar la sedimentación de las células de levadura (Maule 1986). El cuerpo del biorreactor y la base cónica forman un ángulo de 45° con el plano horizontal. Asimismo, se adicionó una chaqueta externa para el enfriamiento del sistema el cual permitirá controlar la temperatura. En procesos de fermentación de cerveza la temperatura de trabajo difiere de acuerdo al tipo de cerveza a producir, por ejemplo, las cervezas “lager” se fermentan a temperaturas entre 7 a 14°C mientras que las cervezas “ale” a temperaturas entre 15 y 25°C. Otro aspecto importante en el biorreactor es el sistema de aireación el cual penetra herméticamente por la parte inferior del cuerpo de biorreactor y termina en un dispositivo de anclaje del difusor de aire. El difusor de aire de material poroso permitió generar burbujas uniformes. Esto tiene importancia en la transferencia de masa de oxígeno al incrementar la fase gaseosa dispersa en la fase continua. En la parte superior está la tapa del biorreactor la cual tiene provistos agujeros para la instalación de electrodos de pH, oxígeno disuelto y temperatura. Acoplado a ella también se encuentra un conducto para la toma de muestra. El cuerpo y la tapa del biorreactor se acoplan mediante 06 (seis) pernos de acero inoxidable AISI 304 que atraviesan tanto la tapa y la base superior del cuerpo. Entre ambos se coloca una empaquetadura de nitrilo para lograr un cierre hermético. Los agujeros están distribuidos simétricamente en el contorno de la tapa de tal modo que el ajuste de los pernos resulte en un cierre uniforme. Adicionalmente, el biorreactor cuenta con dos tubos internos intercambiables de 96 y 48 mm de diámetro, pero de igual longitud (14 cm). Esto permite variar la relación A_r/A_d para procesos fermentativos particulares. La relación A_r/A_d tiene un efecto en el comportamiento hidrodinámico del biorreactor. Cada tubo interno está unido a tres espigas los cuales permiten sujetar internamente desde la parte superior a través de un soporte triangular acoplado al cuerpo del biorreactor mediante pernos, lo que permite regular su posición dentro del biorreactor. Todos los componentes del tubo interno son de acero

inoxidable. En la parte inferior, a la salida, se ha acoplado un tubo de drenaje conectado a una válvula de salida de acero inoxidable AISI 304. Una vez ensamblado el equipo se procedió a realizar el montaje de todas las partes (Figura 21). Para el suministro de aire se usó un compresor de 2 HP el cual estuvo conectado a un rotámetro y este a un filtro de esterilización a través de mangueras. El aire comprimido se reguló a través de una válvula a la salida del compresor. Se usó un rotámetro de bola para medir el flujo de aire de ingreso al biorreactor. El aire antes de su ingreso al biorreactor se separa de bacterias y otros microorganismos mediante una membrana de microfiltración ($2\mu\text{m}$) esterilizable. Para mantener la temperatura a un valor determinado se hace fluir agua a través de la chaqueta de refrigeración del biorreactor la cual se regula con una válvula colocada a la salida del sistema de suministro de agua.

Por otro lado, la determinación de las variables respuestas tales como el tiempo de homogenización se hicieron con la ayuda de un electrodo de pH de precisión ± 0.01 (WTW®) mientras que para el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La}) con la ayuda de un electrodo de membrana de oxígeno disuelto (WTW®) con un rango de medición entre 0 a 20 ppm, acoplado a un sensor de temperatura. Para la obtención de datos confiables es necesario utilizar instrumentos de mucha precisión y antes de su uso deben ser adecuadamente calibrados.

Después del ensamblado se procedió a evaluar el tiempo de homogenización (Θ_m) y el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La}), variando la relación de áreas (A_r/A_d), el flujo de aire (v_{vm}) y el espaciamiento entre el difusor de aire y el tubo de ascenso.

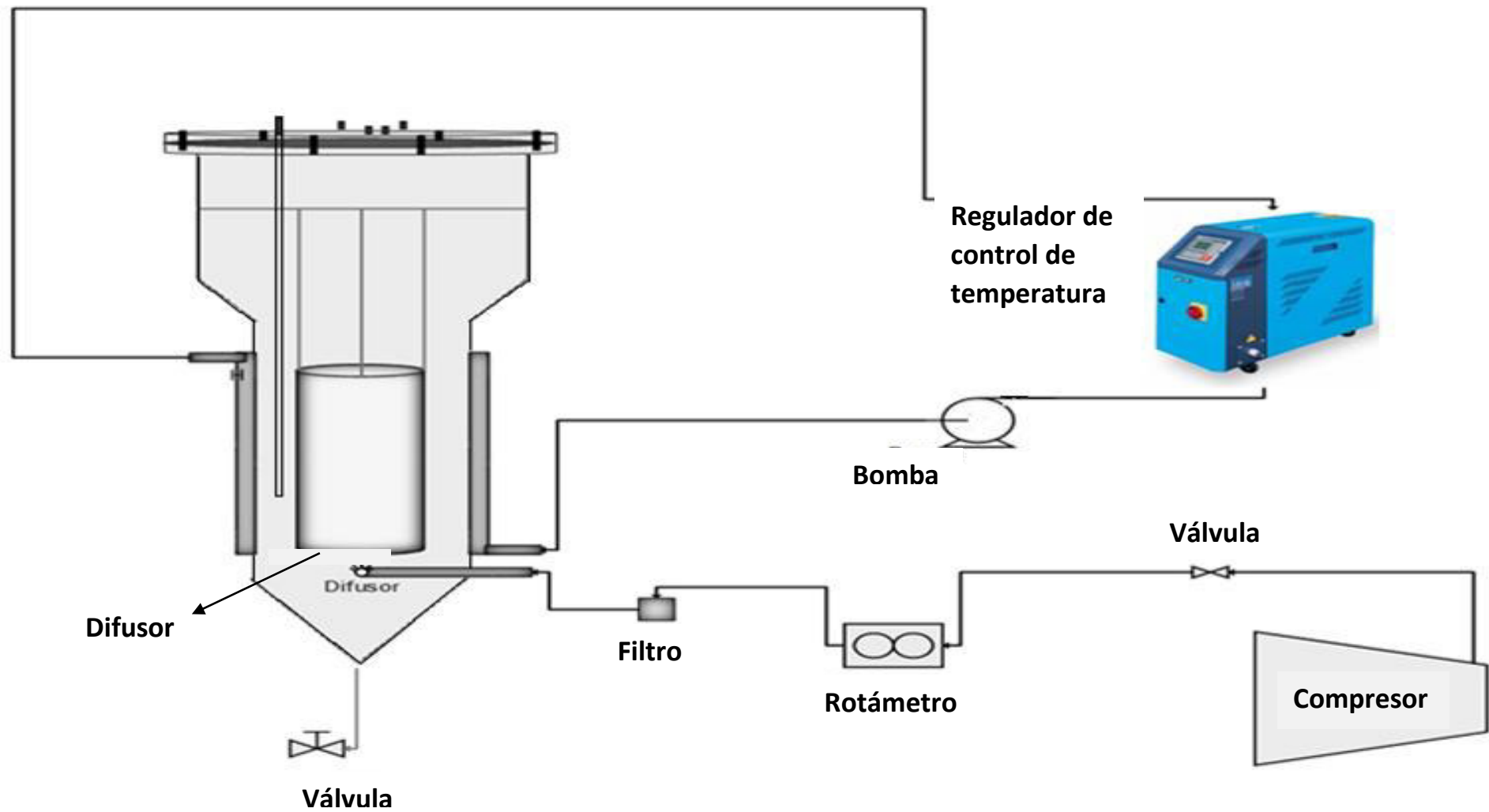


Figura 21. Montaje del sistema de trabajo que incluye el biorreactor “airlift”

4.2. Evaluación del comportamiento hidrodinámico del biorreactor airlift en agua bidestilada

El comportamiento hidrodinámico de un fluido contenido en un biorreactor airlift puede explicarse mediante dos parámetros: el tiempo de homogenización y el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La}). En este estudio se utilizaron dos fluidos de diferentes densidades: agua bidestilada y una solución de jarabe de glucosa de 14 °Brix con el propósito de comparar el efecto de la densidad en estos dos parámetros.

4.2.1. Determinación del tiempo de homogenización (Θ_m)

El tiempo de homogenización es un parámetro muy importante en muchos procesos fermentativos, determina el tiempo en el cual ciertos parámetros tales como el pH, oxígeno disuelto, temperatura, concentración celular y composición del medio son uniformes en todo el volumen del fluido. Un menor tiempo de homogenización indica un rápido restablecimiento de las condiciones originales cuando un medio es sometido a ciertas condiciones de trabajo en presencia de microorganismos. En este estudio primero se evaluó el tiempo de homogenización en un sistema (biorreactor airlift) conteniendo agua bidestilada. La matriz experimental con las variables de entrada se muestra en la Tabla 4. También se muestra el tiempo de homogenización experimental y ajustado.

Tabla 4. *Matriz experimental mostrando las variables de entrada y el tiempo de homogenización en experimentos realizados con agua bidestilada*

N°	Flujo de aire (vvm)	Relación de áreas (A_r/A_d)	Distancia entre el difusor y riser (cm)	Tiempo de homogenización experimental (seg)	Tiempo de homogenización ajustado (seg)
1	0.42	0.8	2	22.36	21.7
2	0.42	0.8	2	21.7	21.7
3	0.24	0.4	2	43.06	43.3
4	0.24	0.8	2	37.04	37.0
5	0.24	0.4	2	44.16	43.3
6	0.24	0.8	4	40.55	40.8
7	0.42	0.4	4	53.02	52.9
8	0.42	0.4	2	33.58	34.0
9	0.24	0.8	4	41.77	40.8
10	0.24	0.4	4	60.82	60.9
11	0.42	0.4	2	33.74	34.0
12	0.24	0.4	4	60.26	60.9
13	0.42	0.8	4	26.49	26.8
14	0.24	0.8	2	36.26	37.0
15	0.42	0.4	4	53.55	52.9
16	0.42	0.8	4	26.36	26.8

Un aspecto importante es la poca variación entre los valores del tiempo de homogenización obtenidos experimentalmente con aquellos ajustados por el modelo generado (Tabla 4) lo cual indica la consistencia de los resultados obtenidos. Adicionalmente, los resultados de tiempo de homogenización se analizaron mediante superficie de respuesta mostrándose en las figuras 22, 23 y 24 respectivamente. Se observa que al aumentar la relación de A_r/A_d y el flujo de aire suministrado al sistema manteniéndose constante la distancia entre el difusor y el tubo de ascenso, resulta en la disminución del tiempo de homogenización concordando con lo mencionado por Klein et al (2003), quién sostuvo que la disminución del tiempo de homogenización se debe al incremento de la velocidad del líquido, causado por un incremento en la diferencia de densidades entre la zona de ascenso y descenso debido a un aumento en la transferencia del oxígeno en la base del tubo de ascenso. Asimismo, se observa que el efecto combinado de ambas variables provoca la mayor disminución del tiempo de homogenización. Desde el punto de vista de la fermentación de cerveza es conveniente trabajar a altos flujos de gas (por ejemplo, CO_2) y mayores relaciones A_r/A_d con la finalidad de disminuir el tiempo de

fermentación. La utilización de oxígeno como gas de ingreso no sería conveniente debido a que disminuiría el rendimiento de etanol.

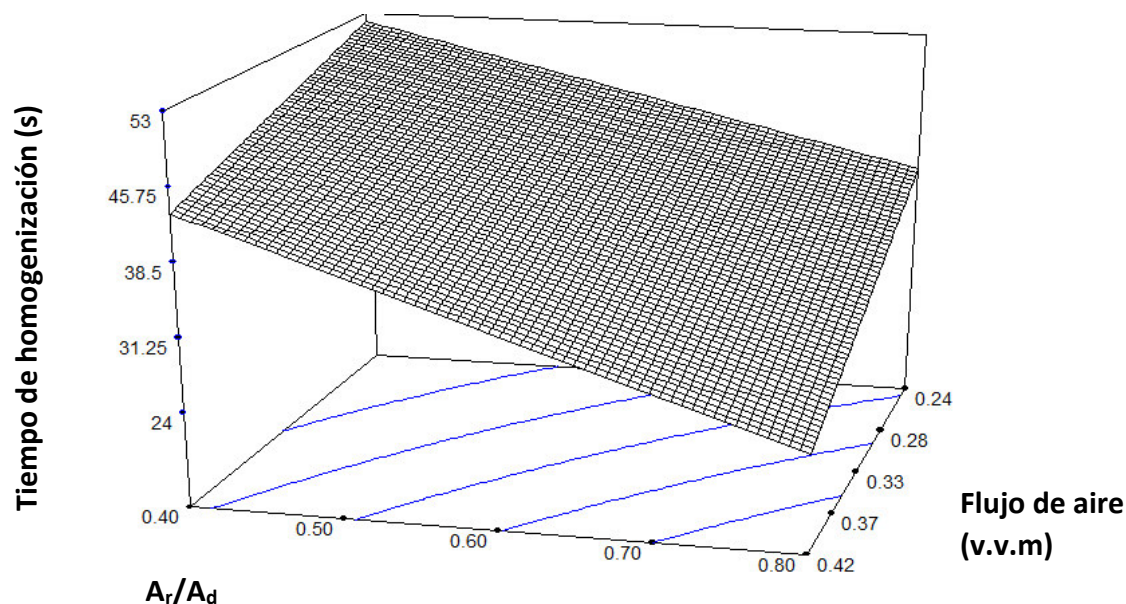


Figura 22. Superficie de respuesta del tiempo de homogenización en función al flujo de aire y relación de áreas (A_r/A_d)

Por otro lado, al aumentar la relación A_r/A_d y disminuir la distancia entre el difusor y el tubo de ascenso, manteniendo constante el flujo de aire, resulta en la disminución del tiempo de homogenización (Figura 23) bajo las condiciones ensayadas. En este caso, la disminución del tiempo de homogenización según Merchuk et al. (1994), se debe al incremento del diámetro del tubo de ascenso y la reducción del espaciamiento entre la base del tubo de ascenso y el difusor de gas provocando una mayor acumulación de gas en la fase continua dentro del tubo de ascenso lo que a su vez incrementa la velocidad del líquido. Además se observa que la disminución del espaciamiento entre la base del tubo de ascenso y el difusor tiene un mayor efecto en el tiempo de homogenización comparado al incremento de la relación A_r/A_d . Por otro lado, es necesario tomar en cuenta la porosidad del difusor de gas, el cual juega un rol importante en el tamaño de las burbujas y en la formación de la fase dispersa. Tecnológicamente un difusor con diámetros de poro pequeños es recomendable si el propósito es incrementar la fase dispersa y así la transferencia de oxígeno al medio en procesos aerobios. En procesos de fermentación de cerveza cuando se trabaja con mostos de alta densidad específica la aireación es importante y necesita optimizarse.

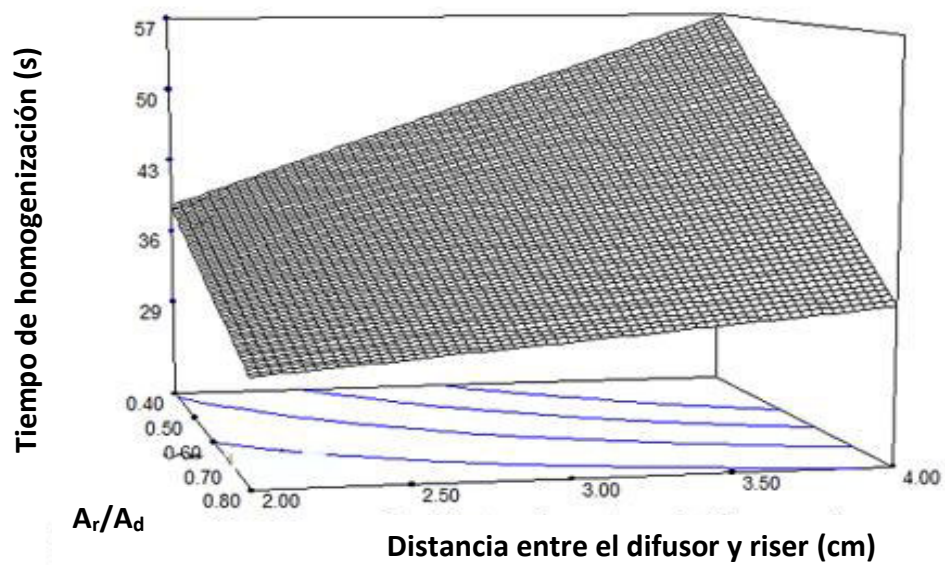


Figura 23. Superficie de respuesta del efecto de A_r/A_d y la distancia entre el difusor y el tubo de ascenso en el tiempo de homogenización

El efecto del flujo de aire y la distancia entre el difusor y el tubo de ascenso (riser) se muestra en la figura 24. Como se ha mencionado, el incremento del flujo de aire y la disminución del espaciamiento entre el difusor y el tubo de ascenso disminuyen el tiempo de homogenización. Similares resultados fueron reportados por Cai et al. (1992). Adicionalmente se observa el efecto combinado de ambas variables en el tiempo de homogenización.

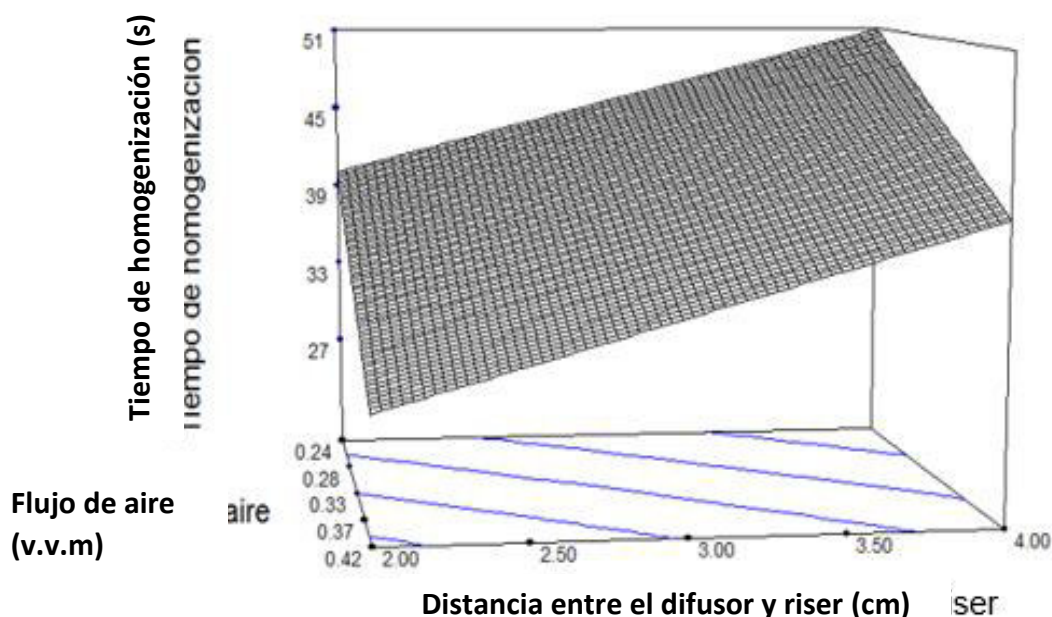


Figura 24. Superficie de respuesta del efecto del flujo de aire y distancia entre el difusor y tubo de ascenso (riser) en el tiempo de homogenización

Los resultados analizados por el software sirvieron para generar un modelo matemático que explica el tiempo de homogenización en función de las variables de entrada.

Tiempo de homogenización (s)

$$= 24.01 - 24.79 * x + 39.17 * y + 14.87 * z - 84.38 * x * y + 3.58 * x * z - 17.28 * y * z$$

En el modelo matemático, x: flujo de aire (vvm), y: relación de áreas (A_r/A_d), z: distancia entre el difusor y el tubo de ascenso (cm). El coeficiente de determinación R^2 del modelo es igual a 0.99, lo cual indica el adecuado ajuste de los datos obtenidos.

4.2.2. Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La})

El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La}) es un parámetro muy importante para muchos procesos fermentativos en los cuales el oxígeno es necesario para la actividad metabólica del microorganismo. La eficiente entrega es un factor limitante en muchos procesos microbianos. La geometría del biorreactor juega un rol importante en su magnitud. Los resultados del efecto de los tres parámetros sobre el K_{La} se presentan en la tabla 5. Ciertos

parámetros condicionan la transferencia de oxígeno, como por ejemplo, la temperatura, viscosidad del medio, condiciones de operación del biorreactor entre otros. De los resultados presentados en la tabla 5 se observa una pequeña variación entre los resultados experimentales y ajustados del K_{La} , lo cual indica lo adecuado del ajuste.

Tabla 5. *Matriz experimental mostrando las variables de entrada y el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La}) en experimentos realizados con agua bidestilada*

N°	Flujo de aire (vvm)	Relación de áreas (A_r/A_d)	Distancia entre el difusor y riser (cm)	K_{La} experimental (1/h)	K_{La} ajustado (1/h)
1	0.42	0.8	2	8.1	7.9
2	0.24	0.4	4	3.4	3.6
3	0.24	0.8	2	4.1	3.9
4	0.42	0.4	4	7.8	8.0
5	0.24	0.8	2	3.4	3.9
6	0.24	0.4	2	3.4	3.4
7	0.42	0.8	4	7.5	7.8
8	0.42	0.4	2	7.8	7.9
9	0.42	0.4	4	8.4	8.0
10	0.42	0.8	4	7.8	7.8
11	0.24	0.4	2	3.7	3.4
12	0.42	0.8	2	7.8	7.9
13	0.24	0.8	4	4.1	3.8
14	0.42	0.4	2	7.7	7.9
15	0.24	0.4	4	3.4	3.6
16	0.24	0.8	4	3.8	3.8

El análisis de los resultados por superficie de respuesta muestra un comportamiento complejo de las variables de entrada (principalmente entre la relación A_r/A_d y el espacio entre el difusor y el tubo de ascenso) frente a la variación del K_{La} . Se puede observar un incremento en el valor del K_{La} a medida que la relación de A_r/A_d incrementa por encima de 0.7 y el espacio entre el difusor y el tubo de ascenso disminuye a valores de 2 cm. Por otro lado, el valor del K_{La} disminuye a medida que la relación A_r/A_d disminuye a valores cercanos a 0.4 y a espacios mínimos entre el difusor y el tubo de ascenso (Figura 25). Desde el punto de vista de cultivo de microorganismos aerobios, condiciones que conduzcan a una mayor K_{La} es ventajoso.

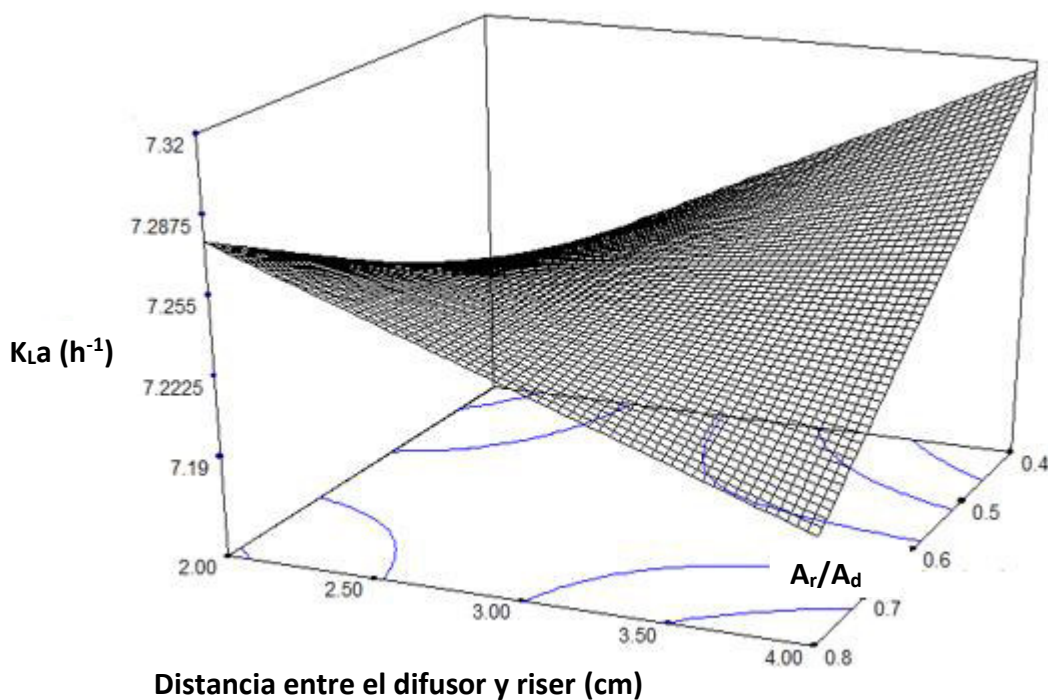


Figura 25. Superficie de respuesta del efecto de la relación A_r/A_d y la distancia entre el difusor y el tubo de ascenso en el K_{La}

Con respecto al flujo de aire se observa un efecto importante, la variación de la relación A_r/A_d mostró no tener un efecto significativo en el K_{La} (Figura 26). Asimismo, de acuerdo al gráfico se observa que el efecto combinado de las dos variables es menor comparado al efecto individual del flujo de aire. El oxígeno es un elemento importante para muchos cultivos celulares principalmente para microorganismos aerobios, por esa razón efectivizar la transferencia de masa de oxígeno es una tarea importante. Un aspecto a considerar en el biorreactor airlift es el tipo de difusor usado. La porosidad determina en gran medida el tamaño de las burbujas y con ello la magnitud de la fase dispersa, el cual tiene efecto en el valor del K_{La} .

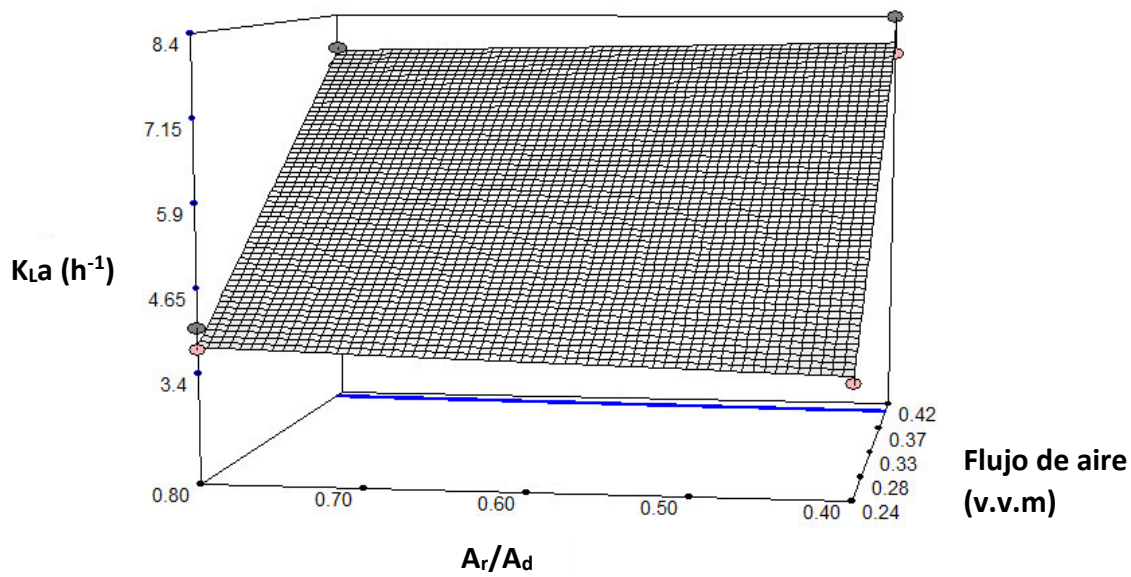


Figura 26. Superficie de respuesta del efecto de la relación A_r/A_d y el flujo de aire en el K_{La}

De los resultados obtenidos en el presente estudio se puede mencionar que para aumentar el K_{La} se tiene las siguientes opciones: incrementar la relación A_r/A_d , disminuir el espacio entre el difusor y el tubo de ascenso e incrementar el flujo de aire. El efecto de estas variables se explica en base a una mayor acumulación de gas en el tubo de ascenso y descenso (Cerri et al., 2010; Juraščík et al., 2006), y esto a su vez depende en gran medida del tipo de difusor y su porosidad. En esta investigación se ha utilizado un difusor de geometría cilíndrica con una porosidad menor a $10 \mu m$, cuyo diámetro es recomendado por Doran (1995). Adicionalmente se ha generado un modelo matemático que explica la dependencia entre las variables de entrada y salida (K_{La}):

$$K_{La} = -3.83 + 27.03 * x + 3 * y + 0.2 * z - 5.9 * x * y - 0.04 * x * z - 0.3 * y * z \quad (12)$$

La ecuación presenta un R^2 de 0.98 el cual indica un buen ajuste. Letras representan, x: flujo de aire (vvm), y: relación de áreas A_r/A_d , z: distancia entre el difusor y el tubo de ascenso (cm).

4.3. Evaluación del comportamiento hidrodinámico del biorreactor airlift utilizando jarabe de glucosa

Se ha evaluado el comportamiento hidrodinámico del biorreactor construido utilizando una solución de jarabe de glucosa de 14 °Brix con la finalidad de simular la concentración de sólidos solubles del mosto de malta que se usa rutinariamente en la fermentación de cerveza.

4.3.1 Tiempo de homogenización (θ_m)

El tiempo de homogenización es un parámetro que debe tomarse en cuenta en muchos procesos fermentativos como por ejemplo en la producción de cerveza. La configuración del biorreactor es importante si se desea obtener valores bajos de este parámetro. Esto sería particularmente interesante si se desea disminuir el tiempo de fermentación y así los costes de producción. En la tabla 6 se muestra los datos experimentales del tiempo de homogenización obtenidos utilizando una solución de jarabe de glucosa a 14 °Brix. Al comparar los resultados obtenidos con agua bidestilada (Tabla 3), se observa que el tiempo de homogenización con la solución de jarabe de glucosa es mayor, esto debido al incremento de la densidad y viscosidad del medio. Resultados similares obtuvieron otros investigadores quienes reportaron que soluciones con mayor viscosidad disminuyen los valores de este parámetro (Kawase et al., 1987). Asimismo, se ha reportado que soluciones de mayor densidad que el agua, son más susceptibles a la coalescencia, esto incrementa el tiempo de homogenización (Oolman et al., 1986).

Tabla 6. Matriz experimental mostrando las variables de entrada y el tiempo de homogenización en experimentos realizados con jarabe de glucosa a 14 °Brix

N°	Flujo de aire (vvm)	Relación de áreas (A_r/A_d)	Distancia entre el difusor y riser (cm)	Tiempo de homogenización experimental (Seg)	Tiempo de homogenización ajustado (Seg)
1	0.42	0.4	2	57.32	57.93
2	0.42	0.4	4	79.98	80.33
3	0.24	0.8	2	75.26	75.60
4	0.42	0.8	2	49.58	49.08
5	0.24	0.4	4	89.52	90.01
6	0.24	0.8	4	77.85	77.76
7	0.42	0.8	4	63.94	64.14
8	0.24	0.8	4	78.17	77.76
9	0.42	0.8	2	49.08	49.08
10	0.42	0.4	2	58.04	57.93
11	0.24	0.4	2	80.9	80.52
12	0.24	0.4	2	80.65	80.52
13	0.42	0.8	4	63.84	64.14
14	0.42	0.4	4	81.18	80.33
15	0.24	0.4	4	90	90.01
16	0.24	0.8	2	75.43	75.60

El análisis de los resultados por superficie de respuesta nos muestra el efecto de las variables de entrada en el tiempo de homogenización. Se observa que a medida que el flujo de aire aumenta, la distancia entre el difusor y tubo de ascenso disminuye y la relación de A_r/A_d aumenta, los valores del tiempo de homogenización disminuyen (Figura 27a, 27b). Comportamientos similares se han observado en experimentos realizados con agua bidestilada. En general la disminución del tiempo de homogenización debido a un incremento de la relación de A_r/A_d , incremento del flujo de aire y una disminución del espaciamiento entre el difusor y el tubo de ascenso se explica debido a la acumulación de gas en el tubo de ascenso el cual provoca una mayor diferencia de densidades entre las zonas de ascenso y descenso y así el aumento de la velocidad de la fase gaseosa y del líquido (Kilonzo et al., 2007; Klein et al., 2003; Merchuk et al., 1994). En procesos fermentativos particularmente en la fermentación de cerveza la disminución del tiempo de homogenización contribuiría a la disminución del tiempo de fermentación, sin embargo, debe tomarse en cuenta algunas consideraciones tales como el

suministro de algún otro gas diferente al aire ya que afectaría el rendimiento de etanol. Por otro lado, altas velocidades de flujo de aire provocarían por una parte la eliminación del CO_2 del medio y la volatilización del etanol producido. Desde el punto de vista tecnológico, la disminución del espaciamiento entre el difusor y el tubo de ascenso, así como el incremento de la relación A_r/A_d sería conveniente para procesos fermentativos de cerveza.

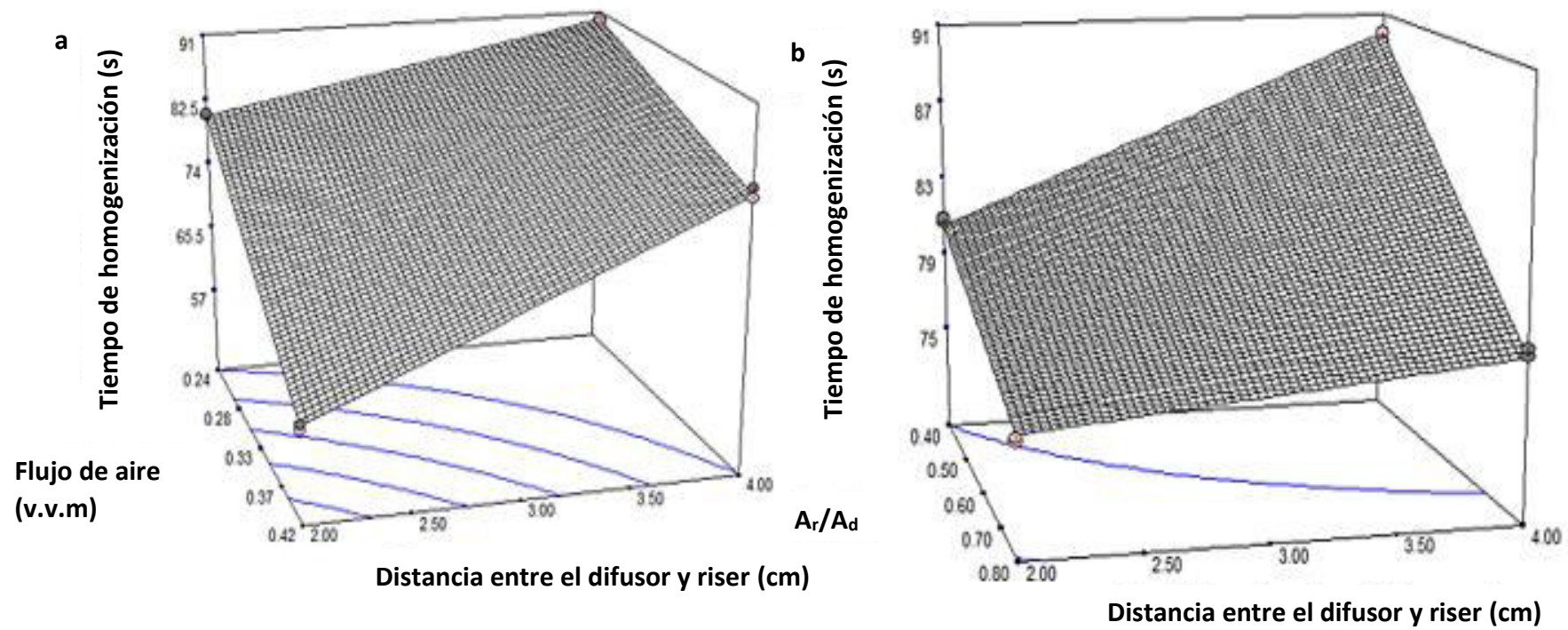


Figura 27. Superficie de respuesta del efecto del flujo de aire, la distancia entre el difusor y el tubo de ascenso y la relación A_r/A_d en el tiempo de homogenización

A partir de los resultados obtenidos se ha generado un modelo matemático que explica el efecto de las variables de entrada sobre el tiempo de homogenización. Dicho modelo presenta un $R^2=0.99$ y es el siguiente:

Tiempo de homogenización (s)

$$= 110.7 - 175.36 * x + 19.11 * y - 0.19 * z - 54.58 * x * y + 35.85 * x * z - 9.16 * y * z$$

Donde, x: flujo de aire (vvm), y: relación de áreas (A_r/A_d), z: distancia entre el difusor y el tubo de ascenso (cm).

4.3.2. Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La})

Se ha determinado el efecto de la relación de áreas (A_r/A_d), distancia entre el difusor y el tubo de ascenso y el flujo de aire en el K_{La} en una solución que simula el contenido de sólidos solubles del mosto de malta (jarabe de glucosa de 14 °Brix). La determinación se realizó de manera similar como en experimentos realizados con agua bidestilada. Los resultados se muestran en la Tabla 7. La solubilidad del oxígeno en un medio líquido además de depender de la temperatura también está influenciada por la concentración de sólidos solubles. En agua pura a 20 °C la máxima solubilidad del oxígeno de acuerdo a la Ley de Henry es 9 mg/L. En la Tabla 7 además se observa los valores de K_{La} ajustados los cuales han sido generados por el modelo desarrollado. Se observa una aceptable aproximación entre ellos comparados con los resultados experimentales.

Tabla 7. Matriz experimental mostrando las variables de entrada y el K_{La} en experimentos realizados con jarabe de glucosa a 14 °Brix

Nº	Flujo de aire (vvm)	Relación de áreas (A_r/A_d)	Distancia entre el difusor y riser (cm)	K_{La} experimental (1/h)	K_{La} ajustado (1/h)
1	0.42	0.8	4	7.2	7.6
2	0.24	0.8	2	4.2	4.3
3	0.24	0.4	4	2.7	2.9
4	0.42	0.4	4	6.4	6.3
5	0.24	0.4	2	1.6	1.5
6	0.42	0.4	2	5.2	5.6
7	0.24	0.4	2	2.0	1.5
8	0.42	0.8	4	7.5	7.6
9	0.24	0.4	4	2.7	2.9
10	0.42	0.8	2	10.5	9.3
11	0.42	0.8	2	8.6	9.3
12	0.42	0.4	4	6.7	6.3
13	0.24	0.8	4	3.5	3.4
14	0.42	0.4	2	5.5	5.6
15	0.24	0.8	4	3.8	3.4
16	0.24	0.8	2	3.8	4.3

Los resultados del diseño de experimentos se presentan en la Tabla 7 y las superficies de respuesta se presentan en las figuras 28 y 29. Se observó que el K_{La} aumenta a medida que el flujo de aire y la relación de áreas (A_r/A_d) incrementa (Figura 28). Además, se ha observado una influencia similar de estos parámetros en el valor de K_{La} comparado a experimentos realizados con agua bidestilada (Figura 26). Un aspecto importante a resaltar en los experimentos realizados con agua bidestilada es el menor efecto de la disminución de la relación de áreas (A_r/A_d) en el valor del K_{La} comparado a experimentos realizados con jarabe de glucosa de 14 °Brix. En fermentaciones con mostos de alta gravedad específica el incremento de la relación A_r/A_d sería conveniente si se quiere incrementar el valor del K_{La} trabajando con bajos valores de flujo de aireación.

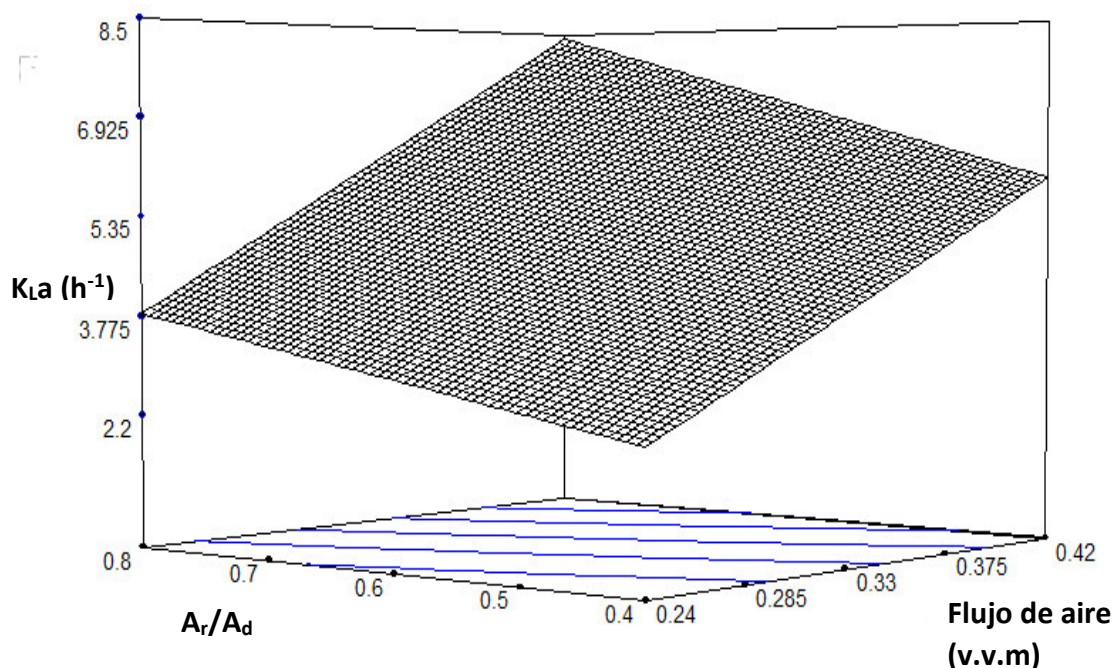


Figura 28. Superficie de respuesta del efecto de la relación A_r/A_d y el flujo de aire en el K_{La}

En la figura 29 se muestra el efecto de la distancia entre el difusor y el tubo de ascenso y la relación A_r/A_d en el K_{La} . Se observa un mayor efecto en el incremento de la relación A_r/A_d en el valor del K_{La} comparado al efecto de variar la distancia entre el difusor y el tubo de ascenso. El incremento del K_{La} se debe a una mayor incorporación de aire en la fase continua y a un mayor volumen de esta en el tubo de ascenso. El acortamiento del espacio entre el difusor y el riser acoplado al incremento de A_r/A_d provocaría un mayor ingreso del aire al tubo de ascenso mejorando la transferencia de oxígeno en el seno del líquido. En fermentaciones de cerveza con mostos de alta gravedad específica, la aireación del mosto es necesario para evitar problemas durante la fermentación. Sin embargo, los valores de aireación son relativamente bajos ya que excesivas cantidades perjudicaría el rendimiento de producción de etanol por las levaduras.

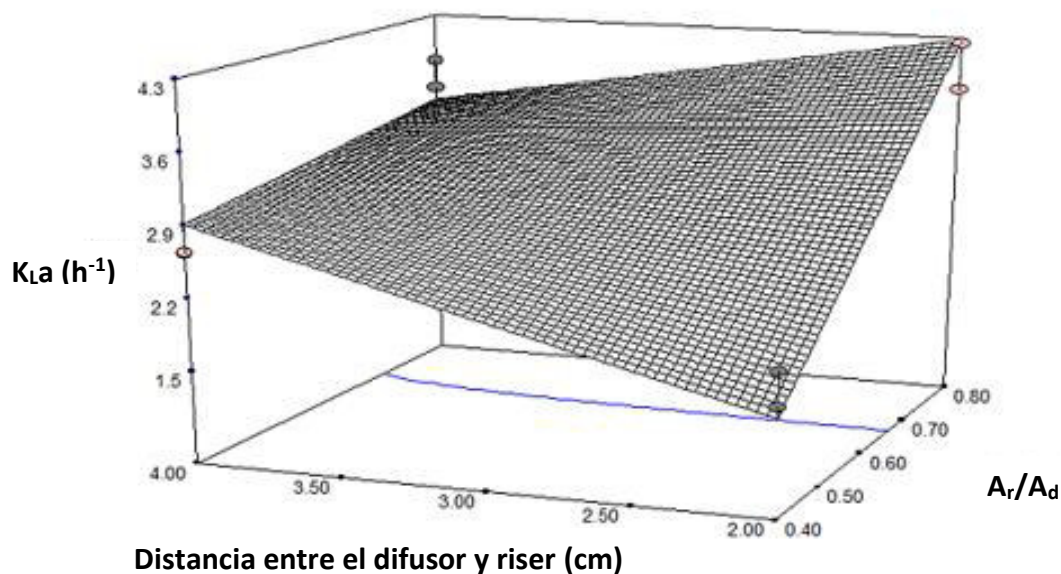


Figura 29. Superficie de respuesta del efecto de la relación de A_r/A_d y distancia entre el difusor y el tubo de ascenso en el K_{La}

Asimismo, se obtuvo un modelo matemático que explica la relación entre las variables de entrada y salida. El modelo matemático que mejor se ajusta ($R^2=0.96$) a los resultados obtenidos es la siguiente:

$$K_{La} = -10.21 + 22.2 * x + 9.58 * y + 2.35 * z + 12.38 * x * y - 2.14 * x * z - 2.85 * y * z$$

Donde, x: flujo de aire (vvm), y: relación de áreas (A_r/A_d), z: distancia entre el difusor y el tubo de ascenso (cm).

El modelo matemático es útil para predecir los valores de K_{La} en función de las variables estudiadas dentro de la zona de experimentación. El modelo es lineal y toma en consideración las interacciones entre las variables de entrada.

En resumen, el incremento del flujo de aire y la relación de áreas (A_r/A_d) así como la disminución de la distancia entre el tubo de ascenso y difusor incrementan el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La}). Adicionalmente en comparación con los resultados observados en experimentos realizados con agua bidestilada la adición de sólidos solubles al medio tiene efecto importante en el tiempo de homogenización y el K_{La} .

4.4. Validación del biorreactor airlift en procesos de fermentación de cerveza

La evaluación del comportamiento hidrodinámico del biorreactor, con agua bidestilada y jarabe de glucosa a 14 Brix, permitió conocer la mejor configuración que conduzca a obtener los mayores valores de K_{La} y menores tiempos de homogenización, ya que dichos parámetros influyen en gran medida en la duración de los procesos fermentativos. Seguidamente se evaluó su aplicabilidad en un proceso, como por ejemplo, la producción de cerveza, el cual se realiza industrialmente en biorreactores cilindro-cónicos a condiciones de limitación de oxígeno utilizando levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. Se utiliza mosto de malta de diferentes gravedades específicas. Aquellos procesos que usan altos valores de °Plato por lo general necesitan oxígeno para ayudar al proceso de fermentación. Con la finalidad de evaluar la usabilidad del biorreactor airlift construido, ha sido necesario realizar fermentaciones de mosto de malta y evaluar la cinética de consumo de azúcares reductores, consumo de nitrógeno amino libre, producción de etanol y viabilidad celular utilizando las condiciones de operación del biorreactor definidas previamente. Antes de los experimentos de fermentación en biorreactor se hicieron ensayos en matraces Erlenmeyer con la finalidad de conocer la actividad fermentativa de la levadura a utilizar.

4.4.1. Fermentación de mosto de malta en matraces

Se realizaron ensayos de fermentación en matraces Erlenmeyer conteniendo mosto de malta de 14 °Plato, valor rutinariamente utilizado en la producción industrial de cerveza comercial. Se evaluó la cinética de fermentación con la finalidad de tomar estos resultados como referencia para los ensayos de fermentación en el biorreactor airlift. Los experimentos se han realizado siguiendo el procedimiento descrito en la Sección 3.4. Los resultados de la cinética de fermentación se muestran en la figura 30. Se observa que la concentración de azúcares reductores iniciales (75.13 g/L) no fue consumido en su totalidad, lo que indica que sólo aproximadamente 56 g/L ha sido convertido en etanol, biomasa celular principalmente. Asimismo, la producción de etanol alcanzó aproximadamente 22 g/L hacia el quinto día de fermentación (Figura 30a). A partir de estos resultados se obtiene un rendimiento en etanol de 0.29 gramos de etanol/gramos de azúcar reductor utilizado, lo cual es un valor bajo para procesos fermentativos de cerveza. Adicionalmente se observa el consumo de nitrógeno amino libre en aproximadamente 300 mg/L hacia el cuarto día de fermentación. El mayor crecimiento

celular se observó hacia el cuarto día manteniéndose casi constante hacia el final de la fermentación. En base a los resultados obtenidos (consumo de azúcares y producción de etanol), el tiempo de fermentación bajo las condiciones ensayadas fue de cuatro días.

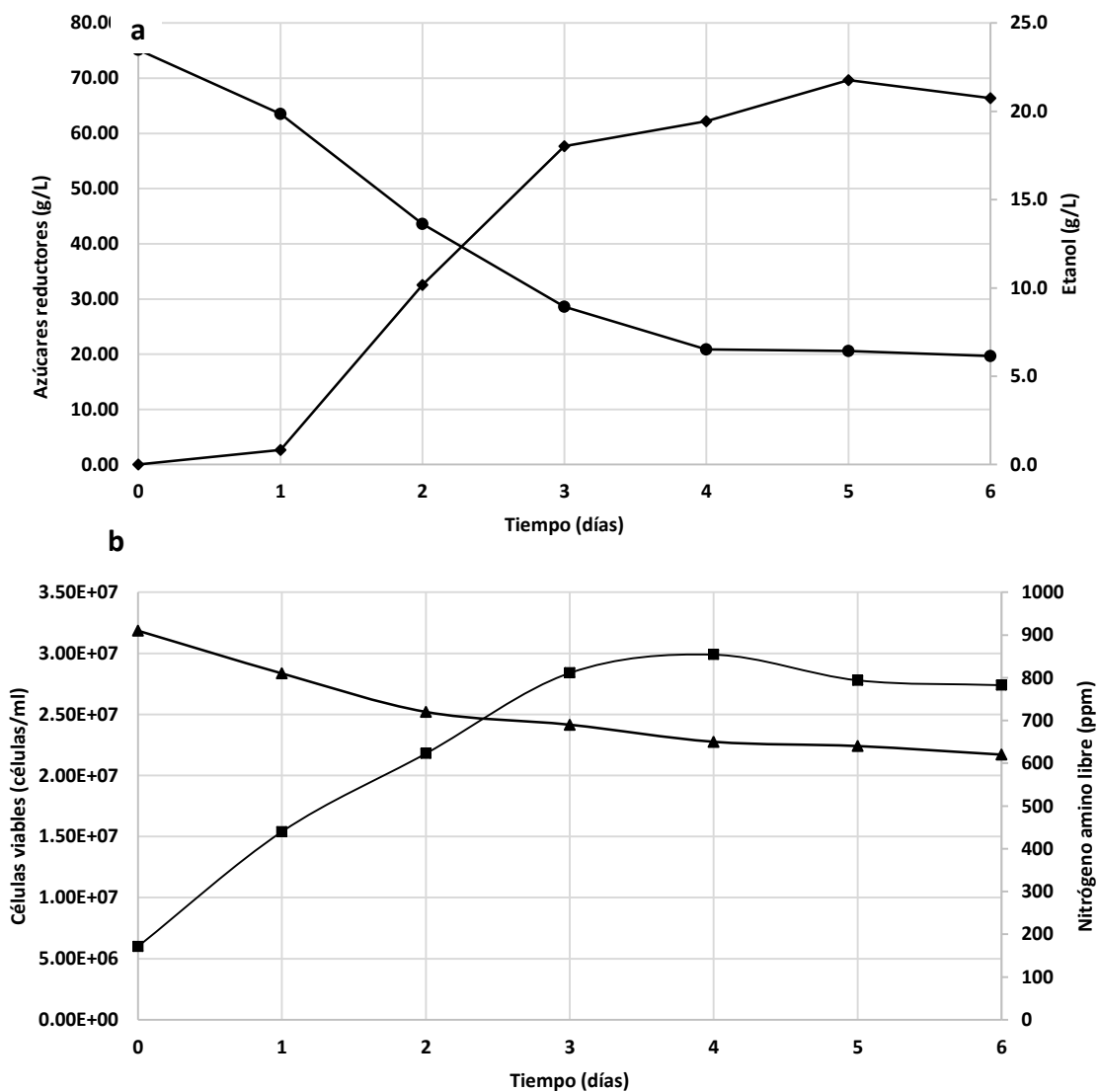


Figura 30. Fermentación de mosto de malta (14 °Plato) en matraces. Cinética de consumo de azúcares (-●-) y producción de etanol (-◆-) (a) y consumo de nitrógeno amino libre (-▲-) y viabilidad celular (-■-) (b)

4.4.2. Fermentaciones de mosto de malta en biorreactor airlift

Existe una variedad de procesos fermentativos los cuales dependen del producto final a obtenerse. Por ejemplo tenemos procesos de producción de ácidos orgánicos (ácido láctico, acético, cítrico, itacónico, etc), vitaminas, aminoácidos, biocombustibles, bebidas alcohólicas, entre otros. Entre las bebidas alcohólicas, la producción de cerveza es de especial interés en esta investigación. Los procesos fermentativos utilizan biorreactores para el cultivo de microorganismos. Esta etapa en el caso de la fermentación de cerveza representa un costo considerable en el costo global del producto. La elección del tipo de biorreactor y las condiciones de operación es crucial si se desea disminuir los requerimientos de energía y así los costos. Los biorreactores de agitación neumática se caracterizan por tener un requerimiento menor de energía comparado a los de agitación mecánica y por esa razón son preferidos rutinariamente para la producción de bebidas alcohólicas como cerveza. En esta investigación se ha diseñado y construido un biorreactor airlift de 10 L en acero inoxidable para ser utilizado en procesos fermentativos. Para ello se ha escogido un proceso tradicional como es la fermentación de cerveza para determinar su usabilidad.

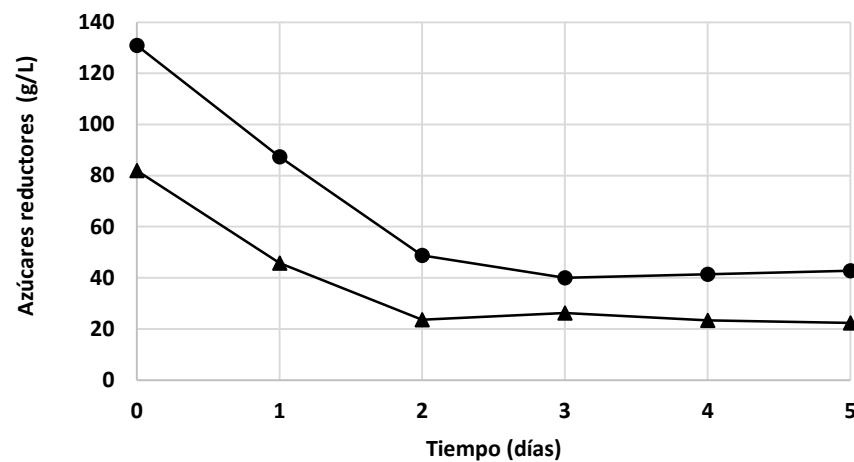
Luego de las fermentaciones en matraces se realizaron fermentaciones en el biorreactor “airlift” con mostos de malta de 14 y 20 °Plato con la finalidad de evaluar el efecto de la gravedad específica y la usabilidad del biorreactor en procesos fermentativos de cerveza. Para la operación del biorreactor se utilizó una relación A_r/A_d igual a 0.8, distancia entre el difusor y el tubo de ascenso de 2 cm y un flujo de aire igual a 0.13 vvm. Para evaluar la performance del proceso se evaluaron las cinéticas de consumo de azúcares reductores y nitrógeno amino libre, producción de etanol y crecimiento celular (Figura 31). De los resultados se observa un mayor consumo de azúcares reductores en fermentaciones realizadas a 20 °Plato y una correspondiente mayor producción de etanol. Sin embargo, al evaluar los rendimientos de etanol alcanzados estos resultaron ser 0.19 en mostos de 14 °Plato y 0.21 en mostos de 20 °Plato, los cuales fueron menores a los esperados. Asimismo, se observó una mayor tasa de crecimiento celular en fermentaciones realizadas en biorreactor comparado a los resultados de experimentos realizados en matraces (Figura 30). Los bajos valores de rendimiento de etanol y una mayor tasa de crecimiento observados podría deberse al efecto de la aireación el cual induciría que el metabolismo de la levadura realice respiración celular debido a las altas concentraciones de oxígeno, disminuyendo de esta forma la producción de etanol (González, 1996; Donald y Judith, 2004).

En base a los resultados de consumo de azúcares reductores se observa que la fermentación terminó antes del tercer día, un tiempo menor comparado a los experimentos realizados en matraces. Un aspecto importante a resaltar es la concentración residual de azúcares fermentables al final de la fermentación 20 g/L en el caso de mostos de 14 °Plato y 40 g/L en el caso de mostos de 20 °Plato. Esto indicaría que hubo un factor limitante que no permitió convertir la totalidad de los azúcares en etanol. Adicionalmente se observa un mayor consumo de nitrógeno amino libre comparado a los experimentos realizados en matraces y se debería al efecto del aire en el crecimiento celular. El mayor consumo de nitrógeno se observó en experimentos realizados con mostos de malta de 20 °Plato. Desde el punto de vista tecnológico altos valores de flujos de aire no es conveniente para los procesos de fermentación de cerveza ya que disminuye los rendimientos de etanol.

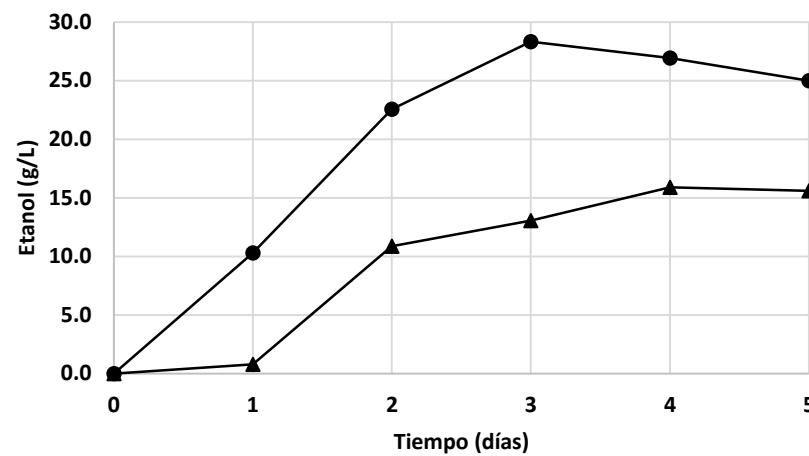
Tabla 8. *Rendimiento de etanol en matraz y biorreactor Airlift*

Descripción	Sacarosa (g/L)	Etanol (g/L)	Y (g etanol/g sacarosa)
Matraz (14 °Plato)	75.13	22	0.29
Biorreactor Airlift (14 °Plato)	82	15.9	0.19
Biorreactor Airlift (20 °Plato)	131	28.3	0.21

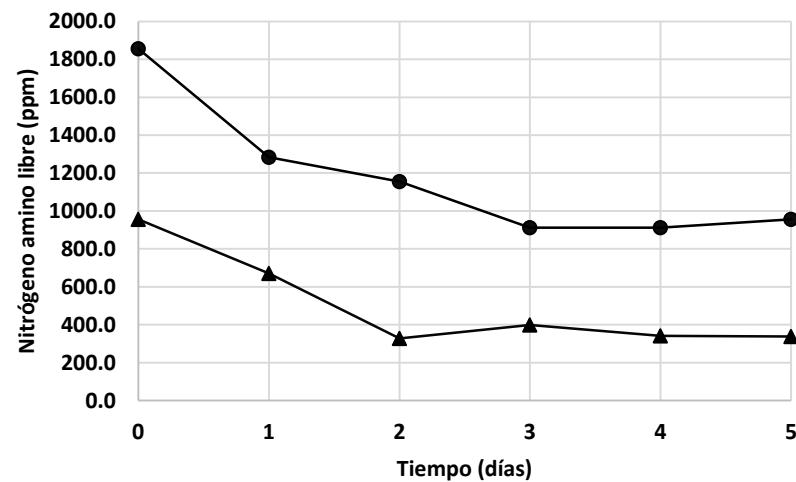
a)



(c)



(b)



(d)

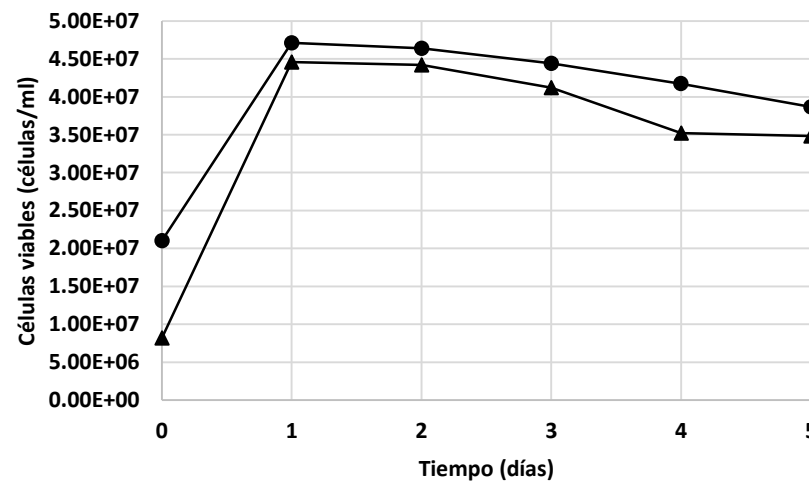


Figura 31. Cinética de consumo de azúcares reductores (a), producción de etanol (b), consumo de nitrógeno amino libre (c) y células viables (b) en fermentaciones realizadas con mostos de diferentes concentraciones de sólidos solubles. (-▲-) 14 °P y (-●-) 20 °P.

4.5 Análisis de evaluación sensorial

Los resultados de la evaluación sensorial de la cerveza obtenida en los experimentos (con mosto de 14 °Plato) se muestran en la Tabla 9. Con respecto al atributo olor se determinó un puntaje promedio de 4 comparado a la cerveza artesanal. El olor es un atributo importante e identificativo de esta bebida, ya que determina la primera impresión al momento de consumirla. Las cervezas en general tienen un olor a malta con algunas características distintivas. Con respecto al atributo “color”, la puntuación alcanzada por la cerveza producida fue de 3.3 ± 0.67 comparado con la puntuación de la cerveza artesanal (2.1 ± 0.88). El color de la cerveza está determinado por una parte por la intensidad del secado de la malta (tiempo y temperatura) en el cual suceden muchas reacciones químicas entre los componentes de la malta, así como también del grado de filtración. En lo referente al atributo “sabor” la cerveza producida obtuvo una puntuación de 4.1 ± 0.88 comparado a la puntuación de la cerveza artesanal (3.6 ± 1.17). El sabor de la cerveza es el resultado de la interacción de muchos componentes los cuales provienen de la malta, lúpulo y aquellos producidos por la levadura durante el proceso fermentativo.

Tabla 9. *Resultados de la evaluación sensorial afectiva de la cerveza producida experimentalmente*

Característica	Cerveza	Media	p<0.05
Sabor	Artesanal	3.6±1.17	0.2945
	Fabricada	4.1±0.88	
Olor	Artesanal	2.8±1.03	0.0064
	Fabricada	4.0±0.67	
Color	Artesanal	2.1±0.88	0.003
	Fabricada	3.3±0.67	

A partir de la evaluación estadística se observa que hay diferencias significativas en olor y color pero no en sabor entre las cervezas evaluadas.

V. CONCLUSIONES

- El incremento del flujo de aire de 0.24 a 0.42 v.v.m, relación Ar/Ad de 0.4 a 0.8 y la disminución del espaciamiento entre el difusor y el tubo de ascenso de 4 a 2 cm resulta en la disminución del tiempo de homogenización y por el contrario en el incremento del K_{La} en experimentos realizados con jarabe de glucosa de 14 °Brix.
- El efecto combinado del flujo de aire, la relación Ar/Ad y el espaciamiento entre el difusor de aire y tubo de ascenso tienen mayor efecto en la disminución del tiempo de homogenización así como en el incremento del K_{La} con agua bidestilada y jarabe de glucosa de 14 °Brix.
- La densidad del medio de cultivo tiene un mayor efecto en el tiempo de homogenización comparado al efecto sobre el K_{La} . El incremento de la densidad del fluido incrementa sustancialmente el tiempo de homogenización mientras que los valores de K_{La} son mínimamente afectados. Esto se evidencia en los resultados de tiempo de homogenización obtenidos.
- En fermentaciones de mosto de malta de 14 °Brix realizadas en matraces Erlenmeyer a condiciones estáticas, los rendimientos en etanol resultaron ser mayores que aquellos obtenidos en experimentos realizados en el biorreactor airlift a condiciones similares debido al suministro continuo de oxígeno, el cual generó que la sacarosa en una mayor cantidad sea utilizada para el crecimiento celular y no para el proceso fermentativo.
- La eficiente entrega de oxígeno al sistema microbiano durante la fermentación de mosto de malta de 14 °P y 20 °P resultó en menor rendimiento de alcohol, mayores tasas de crecimiento de células viables y menor tiempo de fermentación comparado con los experimentos realizados en matraces Erlenmeyer.
- La presencia de azúcares residuales hacia el final de las fermentaciones está relacionado con la actividad fermentativa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* usado, mas no con la configuración y/o parámetros de operación del biorreactor airlift, ya que la levadura utiliza los azúcares para su metabolismo y proceso fermentativo, mientras que la configuración y parámetros de operación influyen en el comportamiento hidrodinámico del fluido a fermentar y esto tiene un efecto directo en la actividad de la levadura.
- Desde el punto de vista sensorial y de rendimiento de etanol, es conveniente trabajar a bajos valores de flujo de aireación y preferentemente con mostos de 20 °Brix.

- Las cervezas de 14 °P producidas en el biorreactor airlift bajo las condiciones ensayadas (Ar/Ad de 0.8, flujo de aire de 0.13 vvm, distancia entre el difusor y riser de 2 cm) tuvieron una aceptación hedónica basada en atributos tales como sabor, olor y color en comparación con la cerveza artesanal.

VI. RECOMENDACIONES

- Los resultados obtenidos en el presente estudio pueden servir de base para futuras investigaciones que involucren la utilización de biorreactores airlift con las características propuestas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Altamirano, C., Berrios, J., Vergara, M., & Becerra, S. (2013). Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(3), 10-10.
2. Allen D.G., Robinson C.W. (1989). Hydrodynamics and mass transfer in *Aspergillus niger* fermentations in bubble column and loop bioreactors. *Biotechnol Bioeng*, 34 731–740.
3. Bao, J., Koumatsu, K., Furumoto, K., Yoshimoto, M., Fukunaga, K., & Nakao, K. (2004). Deactivation kinetics of immobilized glucose oxidase for production of calcium gluconate in an external loop airlift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 22(1), 33-41.
4. Blažej, M., Kiša, M., & Markoš, J. (2004). Scale influence on the hydrodynamics of an internal loop airlift reactor. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 43(12), 1519-1527.
5. Brányik, T., Vicente, A. A., Cruz, J. M., & Teixeira, J. A. (2005). Continuous primary fermentation of beer with yeast immobilized on spent grains: the effect of operational conditions.
6. Brownell, LI & Young, E. (1959). *Equipment design*. Ed. Wiley abd sons Inc., E.U.A.
7. Carvajal M. L. D., & Insuasti A. M. A. (2011). *Elaboración de cerveza artesanal utilizando cebada (hordeum vulgare) y yuca (manihot esculenta crantz)* (Bachelor's thesis).
8. Boulton, C., & Quain, D. (2008). *The brewing process. Brewing yeast and fermentation*. John Wiley & Sons.
9. Cerri, M. O., & Badino, A. C. (2010). Oxygen transfer in three scales of concentric tube airlift bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 51(1), 40-47.
10. Cerri, M. O., Futiwaki, L., Jesus, C. D. F., Cruz, A. J. G., & Badino, A. C. (2008). Average shear rate for non-Newtonian fluids in a concentric-tube airlift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 51-57.
11. Chisti, M. Y., & Moo-Young, M. (1989). Airlift reactors: characteristics, applications and design considerations. *Chemical Engineering Communications*, 60(1-6), 195-242.
12. Chisti, Y. (1998). Pneumatically agitated bioreactors in industrial and environmental bioprocessing: Hydrodynamics, hydraulics, and transport phenomena. *Applied Mechanics Reviews* 51(1): 33–112.
13. Chisti, Y., & Jauregui-Haza, U. J. (2002). Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 10(2), 143-153.

14. Choi, K. H., Chisti, Y., & Moo- Young, M. (1995). Influence of the gas—liquid separator design on hydrodynamic and mass transfer performance of split- channel airlift reactors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 62(4), 327-332.
15. Choi, K. H., Chisti, Y., & Moo-Young, M. (1996). Comparative evaluation of hydrodynamic and gas—liquid mass transfer characteristics in bubble column and airlift slurry reactors. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*, 62(3), 223-229.
16. Coghe, S., Gheeraert, B., Michiels, A., & Delvaux, F. R. (2006). Development of Maillard reaction related characteristics during malt roasting. *Journal of the Institute of Brewing*, 112(2), 148-156.
17. Cunningham, S., & Stewart, G. G. (1998). Effects of high gravity brewing and acid washing on brewers' yeast. *Journal of the American Society of the Brewing Chemists*, 56, 12–18.
18. De Jesus, S. S., Moreira Neto, J., Santana, A., & Maciel Filho, R. (2015). Influence of impeller type on hydrodynamics and gas- liquid mass- transfer in stirred airlift bioreactor. *AIChE Journal*, 61(10), 3159-3171.
19. Donald v., Judith G. 2004). *Bioquímica*, Tercera edición. Editorial Médica Panamericana. España.
20. Doran P. (1995). Ingeniería de los reactores. En *Principio de Ingenieria de Bioprocesos* (pp. 355-356). España: Acribia, S.A.
21. Drandev, S., Penev, K. I., & Karamanev, D. (2016). Study of the hydrodynamics and mass transfer in a rectangular air-lift bioreactor. *Chemical Engineering Science*, 146, 180-188.
22. Fernández, F. A., Sevilla, J. F., Pérez, J. S., Grima, E. M., & Chisti, Y. (2001). Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance. *Chemical Engineering Science*, 56(8), 2721-2732.
23. Fontana, R. C., & da Silveira, M. M. (2012). Production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae* in stirred tank and internal-and external-loop airlift reactors. *Bioresource technology*, 123, 157-163.
24. Freitas, C., & Teixeira, J. A. (1998). Effect of liquid-phase surface tension on hydrodynamics of a three-phase airlift reactor with an enlarged degassing zone. *Bioprocess Engineering*, 19(6), 451-457.
25. González, A. E. E. 1996 Estudio de la represión catabólica por glucosa en " *Candida utilis*" (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).
26. GOROSTIAGA, F. (2008) "Manual del proceso de elaboración de cerveza". Primera Edición, Quito—Ecuador.

27. Gouveia, E. R., Hokka, C. O., & Badino-Jr, A. C. (2003). The effects of geometry and operational conditions on gas holdup, liquid circulation and mass transfer in an airlift reactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 20(4), 363-374.
28. Guieysse, B., Quijano, G., and Muñoz, R. 2011. Airlift bioreactors. In *Comprehensive Biotechnology*. 199-212.
29. Hadjiev, D., Sabiri, N. E., & Zanati, A. (2006). Mixing time in bioreactors under aerated conditions. *Biochemical engineering journal*, 27(3), 323-330.
30. Heijnen, J. J., Hols, J., Van Der Lans, R. G. J. M., Van Leeuwen, H. L. J. M., Mulder, A., & Weltevrede, R. (1997). A simple hydrodynamic model for the liquid circulation velocity in a full-scale two-and three-phase internal airlift reactor operating in the gas recirculation regime. *Chemical Engineering Science*, 52(15), 2527-2540.
31. Hansen J, Kielland-Brandt MC. (2003). Brewer's yeast: genetic structure and targets for improvement. In: H de Winde (ed) *Functional Genetics of Industrial Yeasts*, Topics in Current Genetics 2, Springer, Berlin, 143-170.
32. Hornsey, I. S. (2003). *A history of beer and brewing*. Royal Society of Chemistry. 34.
33. Hough, J. S. (1991). *The biotechnology of malting and brewing* (Vol. 1). Cambridge University Press.
34. Hough, J. (2002). "Biotechnología de la cerveza y de la malta". Zaragoza-España: Editorial Acribia.
35. Ingledew, W. M., & Kunkee, R. E. (1985). Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36(1), 65-76.
36. Jin, B., Yan, X. Q., Yu, Q., & Van Leeuwen, J. H. (2002). A comprehensive pilot plant system for fungal biomass protein production and wastewater reclamation. *Advances in Environmental Research*, 6(2), 179-189.
37. Juraščík, M., Blažej, M., Annus, J., & Markoš, J. (2006). Experimental measurements of volumetric mass transfer coefficient by the dynamic pressure-step method in internal loop airlift reactors of different scale. *Chemical Engineering Journal*, 125(2), 81-87.
38. Kawase, Y., & Moo-Young, M. (1989). Mixing time in bioreactors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 44(1), 63-75.
39. Kawase, Y., Halard, B., & Moo-Young, M. (1987). Theoretical prediction of volumetric mass transfer coefficients in bubble columns for Newtonian and non-Newtonian fluids. *chemical Engineering science*, 42(7), 1609-1617.

40. Kilonzo, P. M., Margaritis, A., & Bergougnou, M. A. (2010). Hydrodynamics and mass transfer characteristics in an inverse internal loop airlift-driven fibrous-bed bioreactor. *Chemical Engineering Journal*, 157(1), 146-160.
41. Kilonzo, P. M., Margaritis, A., Bergougnou, M. A., Yu, J., & Ye, Q. (2007). Effects of geometrical design on hydrodynamic and mass transfer characteristics of a rectangular-column airlift bioreactor. *Biochemical engineering journal*, 34(3), 279-288.
42. Klein, J., Godo, Š., Dolgoš, O., & Markoš, J. (2001). Effect of a gas–liquid separator on the hydrodynamics and circulation flow regimes in internal-loop airlift reactors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76(5), 516-524.
43. Klein, J., Szíjjarto, A., Vicente, A., & Teixeira, J. (2002). Hydrodynamic considerations in three-phase internal-loop airlift bioreactors effect of dual separator and draught tube design. *Chemical & Biochemical Engineering*, 27-31.
44. Klein, J., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A. (2003). Hydrodynamic considerations on optimal design of a three- phase airlift bioreactor with high solids loading. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78(9), 935-944.
45. Klein, J., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A. (2003). Hydrodynamics of a Three- phase Airlift Reactor with an Enlarged Separator—Application to High Cell Density Systems. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 81(3- 4), 433-443.
46. Linko, M., Haikara, A., Ritala, A., & Penttilä, M. (1998). Recent advances in the malting and brewing industry. *Journal of Biotechnology*, 65(2), 85-98.
47. Luo, L., Liu, F., Xu, Y., Yuan, J. (2011). Hydrodynamics and mass transfer characteristics in an internal loop airlift reactor with different spargers. *Chemical Engineering Journal*. 175: 494-504.
48. Machin, C.S., Carraleron, N.A., Amarilys, C. (2016). Levadura *Saccharomyces Cerevisiae* y la producción de alcohol. *Revisión bibliográfica*. Researchgate, 1-24.
49. Mahmood, K. A., Wilkinson, S. J., & Zimmerman, W. B. (2015). Airlift bioreactor for biological applications with microbubble mediated transport processes. *Chemical Engineering Science*, 137, 243-253.
50. Maule, D. R. (1986). A century of fermenter design. *Journal of the Institute of Brewing*, 92(2), 137-145.
51. Meng, A. X., Hill, G. A., & Dalai, A. K. (2002). Modified volume expansion method for measuring gas holdup. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 80(2), 194-199.
52. Menzololla H. (2015), *Procesos Biotecnológicos II*.

53. Merchuk, J. C., Contreras, A., Garcia, F., & Molina, E. (1998). Studies of mixing in a concentric tube airlift bioreactor with different spargers. *Chemical Engineering Science*, 53(4), 709-719.
54. Merchuk, J. C., Ladwa, N., Cameron, A., Bulmer, M., & Pickett, A. (1994). Concentric-tube airlift reactors: Effects of geometrical design on performance. *AIChE Journal*, 40(7), 1105-1117.
55. Nathan, L. (1930). Improvements in the fermentation and maturation of beers. *Journal of the Institute of Brewing*, 36(6), 544-550.
56. Oolman, T. O., & Blanch, H. W. (1986). Bubble coalescence in air-sparged bioreactors. *Biotechnology and bioengineering*, 28(4), 578-584.
57. Pratt-Marshall, P. L., Brey, S. E., de Costa, S. D., Bryce, J. H., & Stewart, G. G. (2002). High gravity brewing—an inducer of yeast stress. *Brewer's Guardian*, 131, 22-26.
58. Rees, E. M. R., & Stewart, G. G. (1997). The effects of increased magnesium and calcium concentrations on yeast fermentation performance in high gravity worts. *Journal of the Institute of Brewing*, 103, 287-291.
59. Roberts T.R. and Wilson R.J.H. (2006). *Handbook of brewing*. New York: Taylor & Francis. 2nd ed., 177-280.
60. Russell, A. B., Thomas, C. R., & Lilly, M. D. (1994). The influence of vessel height and top-section size on the hydrodynamic characteristics of airlift fermentors. *Biotechnology and bioengineering*, 43(1), 69-76.
61. Russell, I., & Stewart, G. G. (1995). A multi-volume comprehensive treatise. *Enzymes, biomass, food and feed. Brewing*. In G. Reed & T. W. Nagodawithana (Eds.), *Biotechnology*. 9 (2), 419-462
62. Sanchis, V., Orive, M., & Ramos, A. J. (2000). *La cerveza. Aspectos microbiológicos*. Lleida, España.
63. Siegel, M. H., & Robinson, C. W. (1992). Application of airlift gas-liquid-solid reactors in biotechnology. *Chemical Engineering Science*, 47(13-14), 3215-3229.
64. Singer C., Holmyard E.J., and Hall A.R. (1954). In *A History of Technology*. Oxford: Clarendon Press, pp. 229-244.
65. Sousa, M.L., Mota, M., Teixeira, J.A. 1994. Influence of operational parameters on the start-up of a flocculation airlift bioreactor. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2(1-3): 181-188.
66. Stewart G. (2013). *Biochemistry Brewing. Biochemistry Food*. 3ra edition, 291-318.

67. Tekić, M. N., Šijački, I. M., Tokić, M. S., Kojić, P. S., Petrović, D. L., Lukić, N. L., & Popović, S. S. (2014). Hydrodynamics of a self-agitated draft tube airlift reactor. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 20(1), 59-69.
68. Vasquez M. (2010). Diseño del sistema de control para un biorreactor de tanque agitado.
69. Zimmerman, W. B., Hewakandamby, B. N., Tesař, V., Bandulasena, H. H., & Omotowa, O. A. (2009). On the design and simulation of an airlift loop bioreactor with microbubble generation by fluidic oscillation. *Food and Bioproducts Processing*, 87(3), 215-227.

ANEXOS

Anexo 1. Cálculos del diseño del biorreactor.

a. Volumen de trabajo

El volumen de trabajo fue de 2.73 L. Este volumen es el 27.3 % del volumen total (10 L).

b. Dimensiones del fermentador.

La dimensión del biorreactor se empieza con el criterio de un número de aspecto (HL/D) igual a 2.5.

$$HL = 2.5 * D$$

La ecuación del volumen es:

Volumen = volumen del cuerpo cilíndrico + volumen del cono inferior

$$v = \pi * \frac{D^2}{4} * \left(HL - \frac{D}{2} \right) + \pi * \frac{D^3}{24}$$

$$2730 = \pi * 4 * \frac{D^3}{8} - \pi * \frac{D^3}{24}$$

$$D \cong 12 \text{ cm} = 120 \text{ mm}$$

$$HL = 30 \text{ cm} = 300 \text{ mm}$$

c. Espesor del acero inoxidable

La ecuación es la siguiente:

$$Espesor(ea) = \rho * \frac{12 * D * (HL - 1)}{144 * 2 * S * E} + c$$

Donde:

ρ = Densidad del mosto (kg/m³)

D= diámetro del biorreactor (m)

HL= Altura del líquido (m)

S= Factor de seguridad (kg/m³)

E= Eficiencia de la soldadura.

c = 0.00158 m

$$ea = 1020 * 0.12 * \frac{(0.24 - 1)}{144 * 2 * 0.85 * 76654} + 0.00156$$

$$ea = 1.5 \text{ mm} \cong 2 \text{ mm}$$

d. Diámetro del tubo interior

Para el cálculo del tubo interior de menor y mayor diámetro se tomará el siguiente criterio:

- *Tubo interno de diámetro mayor:*

La relación entre el diámetro del tubo interno y del cuerpo del biorreactor es de 0.8.

$$\frac{D_M}{D} = 0.8$$

$$D_M = 0.8 * 120 = 96 \text{ mm}$$

Donde:

D_M = diámetro mayor (mm)

D = diámetro del cuerpo del biorreactor (120 mm)

- *Tubo interno de diámetro menor:*

La relación entre el diámetro del tubo interno y del cuerpo del biorreactor es de 0.4.

$$\frac{D_m}{D} = 0.4$$

$$D_m = 0.4 * 120 = 48 \text{ mm}$$

Donde:

D_m = diámetro menor (mm)

D = diámetro del cuerpo del biorreactor (120 mm)

e. Flujo de agua de enfriamiento en el enchaquetado

Se tomó de referencia el calor metabólico de 3 a 5 kw/m³ que se libera en el proceso fermentativo.

La ecuación utilizada fue:

$$Q = \dot{m} * Cp * (T_2 - T_1)$$

Donde:

Q = Flujo de calor (Kw/m³)

\dot{m} = Flujo másico de agua (kg/s)

T₂= Temperatura final del agua

T₁= Temperatura inicial de agua

$$5 \frac{Kw}{m^3} * 2730 m^3 = \dot{m} * 4.18 \frac{KJ}{Kg * ^\circ C} * (24 - 18^\circ C)$$

$$\dot{m} = 1.9 \text{ kg agua/h}$$

f. Ángulo de inclinación de la zona de desgasificación y la zona de sedimentación

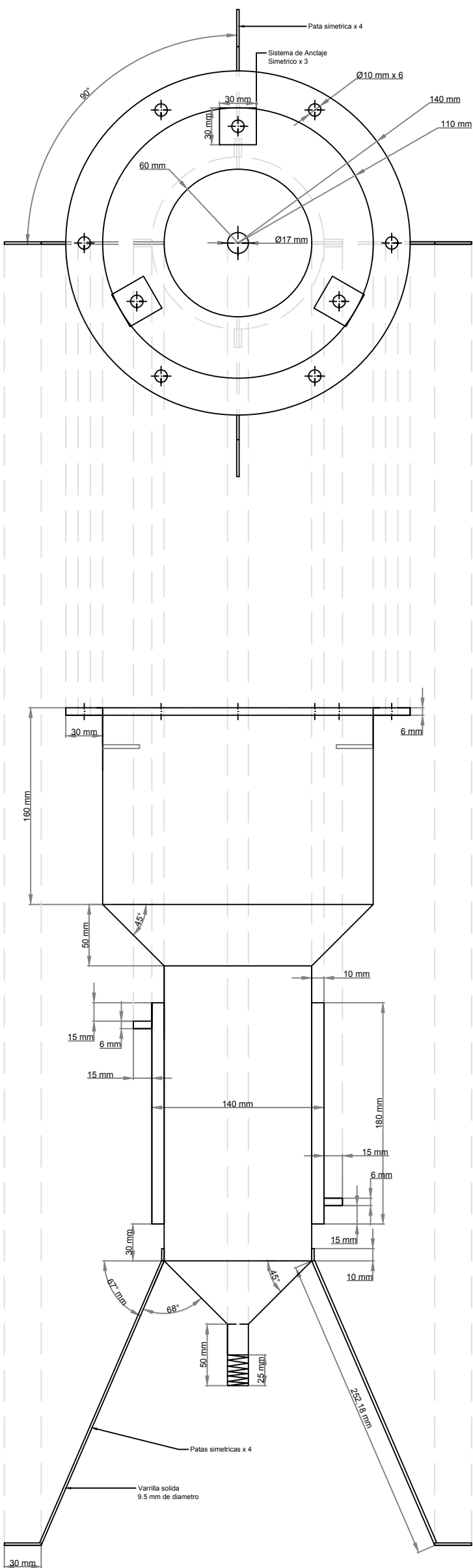
El ángulo de inclinación de la zona de desgasificación y sedimentación con el plano horizontal fue de 45 °C.

Anexo 2. Plano de la cacheta de enfriamiento, tubo externo y sistema de anclaje del tubo interno



UNIVERSIDAD NACIONAL
MAYOR DE SAN MARCOS
UNIVERSIDAD DEL PERU, DECANA DE AMERICA

Anexo 2. Plano de la cacheta de enfriamiento, tubo externo y sistema de anclaje del tubo interno



ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

PROYECTO: DISEÑO Y CONSTRUCCION DE BIORREACTOR AIRLIFT

ASESORADO POR : DR. ING. WALDIR ESTELA ESCALANTE, PhD.

PLANO: DESCRIPTIVO

ELABORADO POR: HUAMAN GASTELU, DAVID
LEON FLORES, EMILIANO

VISTA: PLANTA Y FRONTAL
CHAQUETA DE ENFRIAMIENTO, TUBO EXTERNO Y SISTEMA DE ANCLAJE DEL TUBO INTERNO

CODIGO :
DBA-01

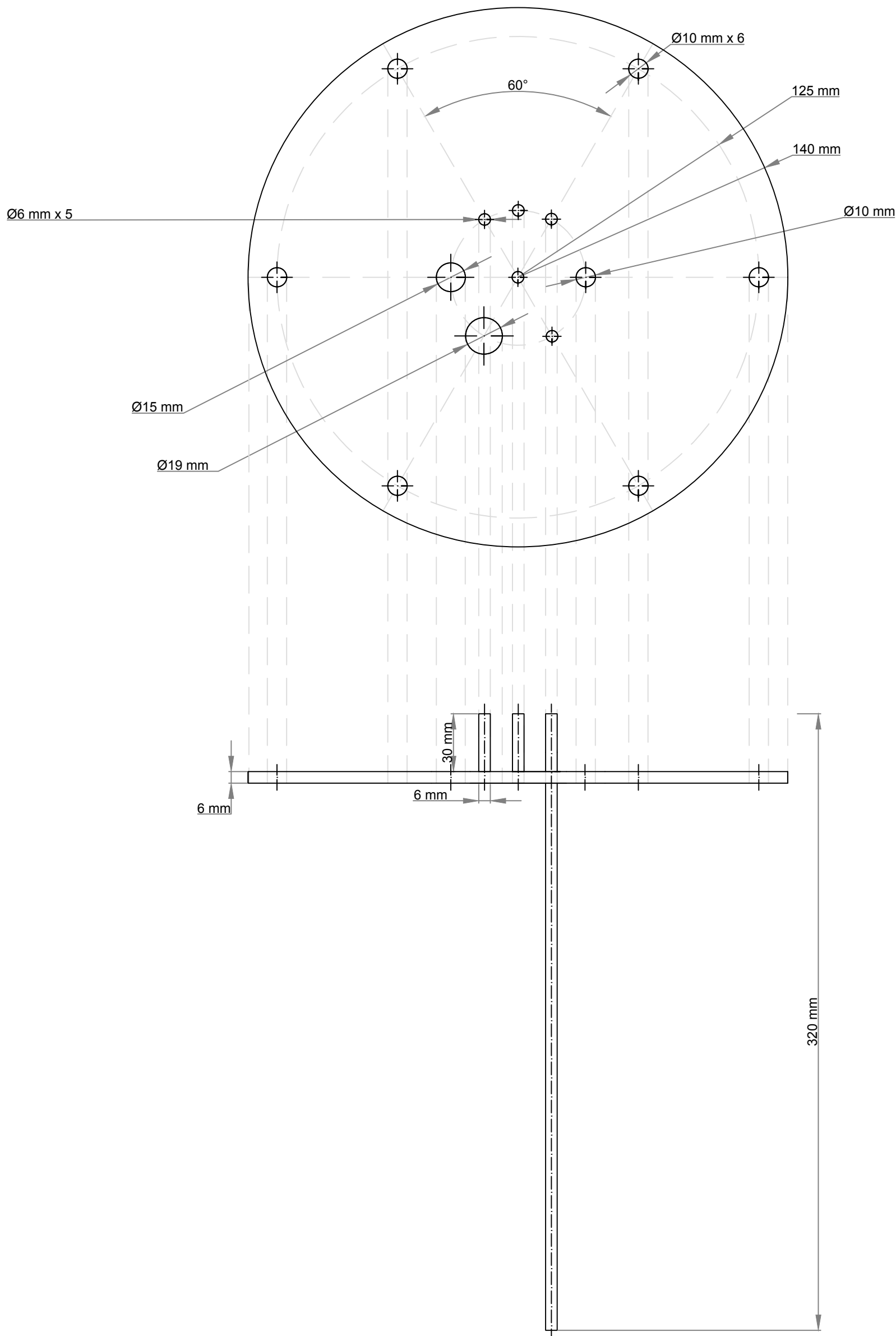
LAMINA Nº :
1/5

PROYECTO :
.....

ESCALA: 1/4.0

FECHA: OCTUBRE 2016

Anexo 3. Plano de la tapa superior del biorreactor airlift



ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

PROYECTO: DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE BIORREACTOR AIRLIFT

ASESORADO POR : DR. ING. WALDIR ESTELA ESCALANTE, PhD.

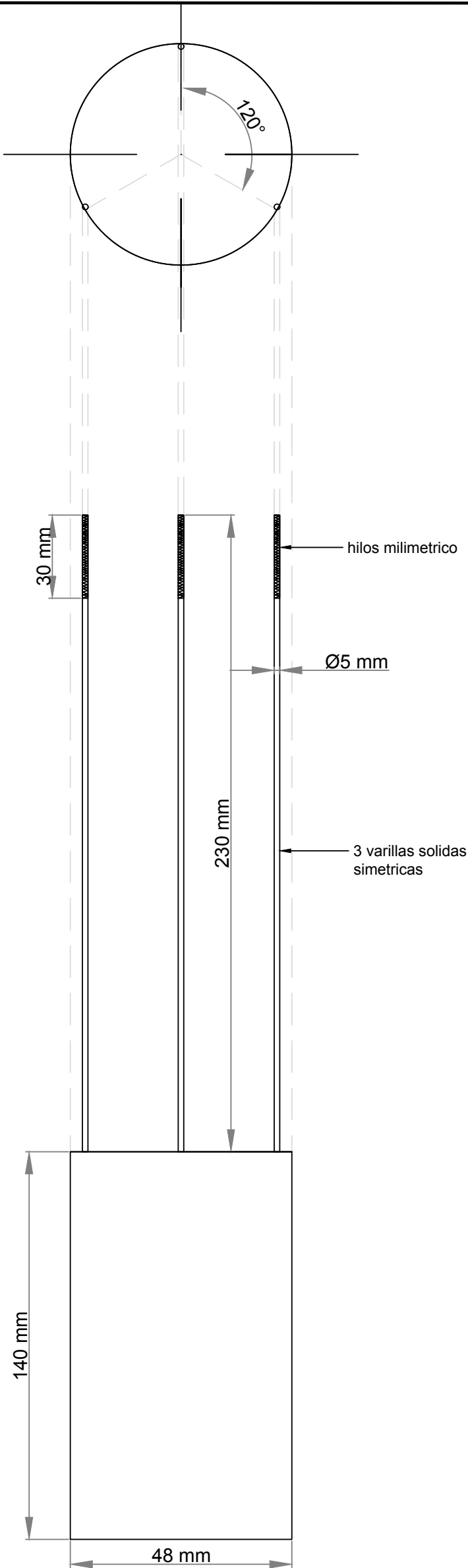
PLANO: DESCRIPTIVO

ELABORADO POR: HUAMAN GASTELU, DAVID
LEON FLORES, EMILIANO

VISTA: PLANTA Y FRONTAL
TAPA SUPERIOR DEL BIORREACTOR

CODIGO :
DBA-01
LAMINA Nº :
2/5
PROYECTO :
.....
ESCALA:
1/2.2
FECHA:
OCTUBRE 2016

Anexo 4. Plano del tubo interno de menor diámetro



ESCUELA ACADEMICA PROFESIONAL
INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

PROYECTO: DISEÑO Y CONSTRUCCION DE BIORREACTOR AIRLIFT

ASESORADO POR : DR. ING. WALDIR ESTELA ESCALANTE, PhD.

PLANO: DESCRIPTIVO

ELABORADO POR: HUAMAN GASTELU, DAVID
LEON FLORES, EMILIANO

VISTA: PLANTA Y FRONTAL
TUBO INTERNO DE MENOR DIAMETRO (64 mm)

CODIGO :

DBA-01

LAMINA Nº :

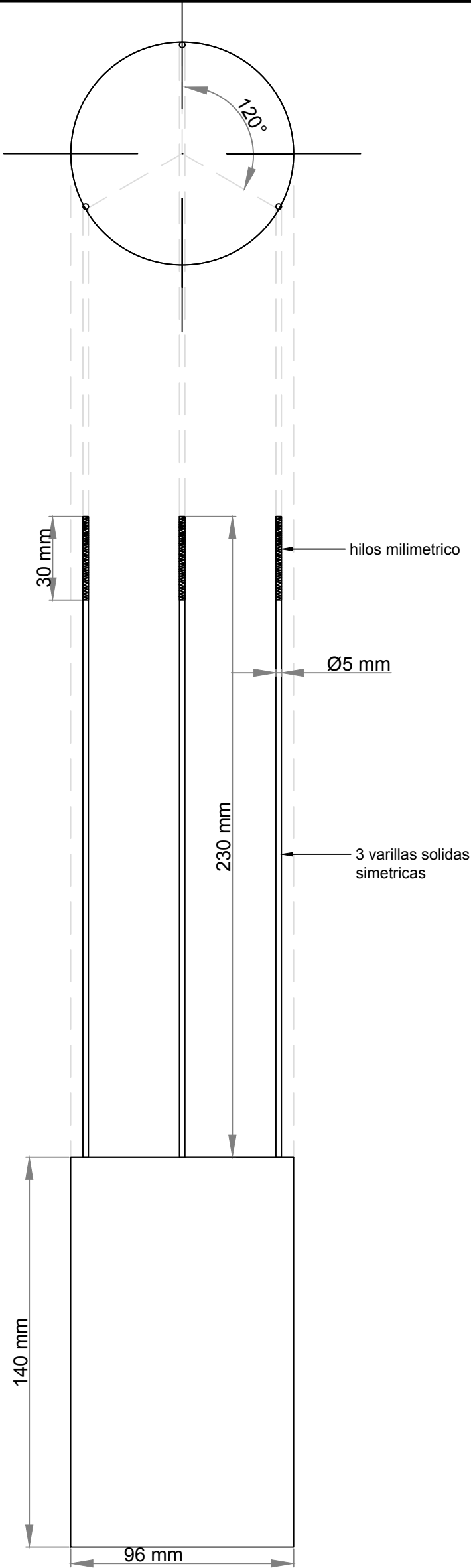
3/5

PROYECTO :

ESCALA: 1/1.8

FECHA: OCTUBRE 2016

Anexo 5. Plano del tubo interno de mayor diámetro



ESCUELA ACADEMICA PROFESIONAL
INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

PROYECTO: DISEÑO Y CONSTRUCCION DE BIORREACTOR AIRLIFT

ASESORADO POR : DR. ING. WALDIR ESTELA ESCALANTE, PhD.

PLANO: DESCRIPTIVO

ELABORADO POR: HUAMAN GASTELU, DAVID
LEON FLORES, EMILIANO

VISTA: PLANTA Y FRONTAL
TUBO INTERNO DE MAYOR DIAMETRO (80 mm)

CODIGO :

DBA-01

LAMINA Nº :

4/5

PROYECTO :

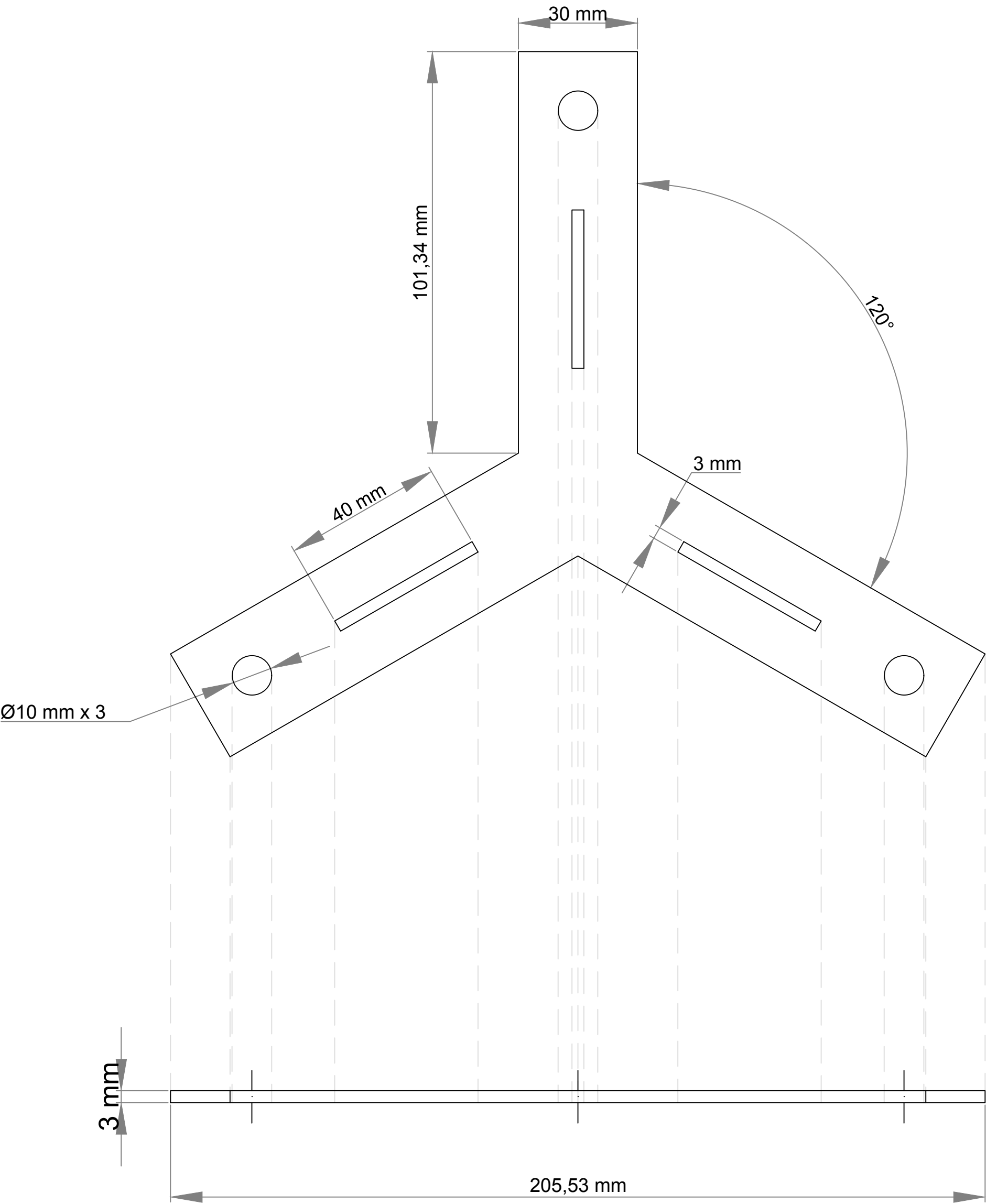
ESCALA:

1/1.8

FECHA:

OCTUBRE 2016

Anexo 6. Plano del sistema de anclaje y regulador del tubo interno



ESCUELA ACADEMICA PROFESIONAL
INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

PROYECTO: DISEÑO Y CONSTRUCCION DE BIORREACTOR AIRLIFT

ASESORADO POR : DR. ING. WALDIR ESTELA ESCALANTE, PhD.

PLANO: DESCRIPTIVO

ELABORADO POR: HUAMAN GASTELU, DAVID
LEON FLORES, EMILIANO

VISTA: PLANTA Y FRONTAL
SISTEMA DE ANCLAJE Y REGULADOR DE TUBO INTERNO

CODIGO :

DBA-01

LAMINA Nº :

5/5

PROYECTO :

.....

ESCALA: 1/1

FECHA: OCTUBRE 2016

Anexo 7. Difusor poroso utilizado en la aireación del medio líquido en el biorreactor “airlift”



Anexo 8. Rotámetro, medidor de flujo de aire que ingresa al sistema.



Anexo 9. **Válvula reguladora del flujo de aire.**



Anexo 10. **Compresor, generador del flujo de aire.**



Anexo 11. Filtro de porosidad de 2 μm .



Anexo 12. Biorreactor Airlift Ensamblado.



Anexo 13. **Tubo interno del biorreactor Airlift.**



Anexo 14. **Sistema de anclaje del tubo interno.**



Anexo 15. **Vista interna del biorreactor Airlift.**



Anexo 16. Glosario de términos

Constante volumétrica de transferencia de masa del oxígeno (K_La): coeficiente que indica la capacidad de transferir oxígeno del gas al líquido.

Área interfacial específica (a): Se define como el área superficial de las burbujas por unidad de volumen de dispersión gas-líquido.

Coalescencia: se define como un proceso binario en el que dos burbujas de un gas o dos gotas de un líquido se fusionan para formar una sola burbuja o gota.

Retención de gas: Es la fracción de gas en la dispersión de la fase gas-líquido en tubo de ascenso y tubo de descenso.

Velocidad superficial de gas (UGR): representa la relación entre el flujo de volumen de gas y la superficie de sección transversal por la cual pasa el flujo de gas.

Tiempo de homogenización (θ_m): Es un parámetro que indica la intensidad y homogeneidad de la mezcla en caldos de fermentación.

Separador de gas: Es la zona superior del biorreactor donde se da la separación de las burbujas de gas del líquido.

Fuerza de cizalla: Es la deformación de las levaduras debido a una fuerza externa, perjudicial para caldos de fermentación.

Velocidad lineal: Representa la velocidad de fase eficaz en un lugar seleccionado.

Burbuja homogénea: se caracteriza por un flujo de gas disperso en forma de burbujas con una distribución de tamaño de burbuja con una intensidad baja de turbulencia.

Velocidad específica de consumo de oxígeno: Es el consumo de oxígeno por unidad de célula.

Número de aspecto: Es la relación entre la altura del cuerpo del biorreactor con su diámetro (H/D).

Gradiente de densidad: Se define como la diferencia de densidades que existe entre el separador de gas y el tubo de subida, lo que permite la circulación del fluido.

Difusión molecular: Es el movimiento de las moléculas de los componentes de una mezcla debido a la diferencia de concentración existente en el sistema.

Ratio A_r/A_d : relación de área del ducto de descenso con el área de ducto de ascenso, variable fundamental para el diseño del biorreactor ALR.

°PLATO: cantidad en gramos de extracto seco primitivo del mosto original de la cerveza contenido en 100 gramos de dicho mosto a la temperatura de 20° C.